

Polymerní micely jako nosiče aktivních látek

Bc. Markéta Petrželková

Diplomová práce
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Markéta Petrželková**
Osobní číslo: **T18297**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Polymerní micely jako nosiče aktivních látek**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

V teoretické části vypracujte rešerši na dané téma. Charakterizujte polymerní amfifilní látky a jejich micelizační charakteristiky. Dále se soustředte na aktivní složky vhodné pro zabudování do polymerních micel a praktický význam těchto systémů.

Praktická část:

V praktické části charakterizujte povrchové vlastnosti vybraných polymerních surfaktantů. Připravte vzorky s obsahem různých hydrofobních aktivních látek a charakterizujte jejich fyzikální a stabilitní vlastnosti. Dosažené výsledky diskutujte a zformulujte závěry práce.

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] Bodratti, A. M., Alexandridis, P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials* 2018, 9, p. 1224.
- [2] Chauhari, S. P., Patil, J. R. Study of Block Copolymer Micelles as Vehicles for Hydrophobic drug Lamotrigine. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 2014, p. 56766.
- [3] KRONBERG, B. *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers* (str. 197), UK, John Wiley & Sons, Inc., 2016, ISBN 978-1-119-96124-6.
- [4] THORMAR, H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, UK, John Wiley & Sons, Inc., 2011, ISBN 978-0-470-74178-8.
- [5] MYERS, D. *Surfactant Science and Technology*. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2006, ISBN 978-0-471-68024-6.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jana Sedlaříková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá problematikou částic připravených z polymerních povrchově aktivních látek. Teoretická část se zaměřuje na obecnou charakteristiku polymerních tenzidů a jejich micelizační vlastnosti se zřetelem na poloxamery použité v experimentální části. Dále jsou zde charakterizovány aktivní látky vhodné k solubilizaci do polymerních micel.

V rámci praktické části byly připraveny a charakterizovány roztoky na bázi vybraných polymerních tenzidů, poloxameru P184, P188 a P407, a jejich kombinací s aktivními látkami thymolem, tymiánovým a eukalyptovým olejem. Pozornost byla soustředěna na fyzikálně-chemické vlastnosti a stabilitu s ohledem na potenciální praktické aplikace poloxamerů ve formě nosičů aktivních látek.

Klíčová slova: esenciální olej, kritická micelární koncentrace, poloxamer, stabilita, tenzid, thymol

ABSTRACT

The diploma thesis deals with the issue of particles prepared from polymeric surface active agents. The theoretical part focuses on the general characteristics of polymeric surfactants and their micellization properties with respect to poloxamers used in the experimental part. Furthermore, active substances suitable for solubilization into polymer micelles are characterized here.

In the practical part, solutions based on selected polymeric surfactants poloxamer P184, P188, P407, and their combination with active substances thymol, thyme and eucalyptus oil were prepared and characterized. Attention was focused on physical and chemical properties and stability with respect to potential practical applications of poloxamers in the form of active substance carriers.

Keywords: essential oil, critical micellar concentration, poloxamer, stability, surfactant, thymol

Především bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Janě Sedlaříkové, Ph.D. za odborné vedení, řadu cenných rad, vstřícný přístup, trpělivost a všestrannou pomoc při vypracování této práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za pomoc při realizaci mikrobiologického testu. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině, příteli a kamarádům, kteří mě během studia vždy podporovali.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 AMFIFILNÍ LÁTKY.....	11
1.1 MICELY.....	11
1.2 KRITICKÁ MICELÁRNÍ KONCENTRACE.....	12
1.2.1 Stanovení kritické micelární koncentrace.....	12
1.3 VÝZNAM MICEL.....	13
1.3.1 Směsné micely.....	13
1.4 GIBBSOVA ENERGIE MICELIZACE.....	14
1.5 CHOVÁNÍ NA ROZHRANÍ.....	15
2 POLYMERNÍ AMFIFILNÍ LÁTKY.....	17
2.1 POLYMERNÍ MICELY.....	17
2.2 CHARAKTERIZACE POLYMERNÍCH ROZTOKŮ A MICEL.....	17
2.2.1 Velikost částic.....	17
2.2.2 Zeta potenciál.....	18
3 AKTIVNÍ LÁTKY PRO INKORPORACI DO MICEL.....	20
3.1 LÉČIVA.....	20
3.2 ESENCIÁLNÍ OLEJE.....	21
3.2.1 Eukalyptový olej.....	23
3.2.2 Tymiánový olej.....	23
3.2.3 Thymol.....	23
3.3 VITAMINY.....	24
3.3.1 Vitamin C.....	24
3.3.2 Vitamin E.....	25
4 CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH POLYMERNÍCH TENZIDŮ.....	26
4.1 POLOXAMER 184.....	26
4.2 POLOXAMER 188.....	26
4.3 POLOXAMER 407.....	27
5 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	29
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	32
6 CÍLE PRÁCE.....	33
7 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POSTUPY.....	34
7.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	34
7.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	34
7.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ POLOXAMERŮ.....	35

7.4	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ POLOXAMERŮ S AKTIVNÍ LÁTKOU	35
7.5	STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE JEDNOTLIVÝCH POLOXAMERŮ	37
7.7	MĚŘENÍ VIZKOZITY	38
7.8	MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC POMOCÍ DLS	39
7.9	MĚŘENÍ STABILITY ČÁSTIC POMOCÍ ZETA POTENCIÁLU	39
7.10	STANOVENÍ MAXIMÁLNÍ ADITIVNÍ KONCENTRACE	40
7.11	ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK – DISKOVÁ DIFUZNÍ METODA	40
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
8.1	STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE TENZIDŮ A JEJICH SMĚSÍ.....	41
8.2	STANOVENÍ BODU ZÁKALU.....	47
8.3	STANOVENÍ VIZKOZITY	47
8.4	STANOVENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC	50
8.5	STANOVENÍ ZETA POTENCIÁLU	55
8.6	STABILITNÍ STUDIE	58
8.8	STANOVENÍ ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINNOSTI.....	67
	ZÁVĚR	70
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	72
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	81
	SEZNAM OBRÁZKŮ	83
	SEZNAM TABULEK.....	85

ÚVOD

Polymerní amfifilní látky patří díky své struktuře a vlastnostem k velmi zajímavým materiálům, které jsou intenzivně studovány jako potenciální nosiče aktivních činidel, za účelem prevence nežádoucích degradačních procesů a zvýšení jejich stability. Takové systémy pak mohou mít širokou oblast využití, jako je například potravinářský, kosmetický a farmaceutický průmysl.

Z aktivních látek lze pro inkorporaci do vhodné matrice využít různá léčiva a vitamíny. V kosmetickém průmyslu jsou nejčastěji solubilizovány látky, které mají hydratační, antioxidační a antibakteriální účinky, a také parfemační činidla. Pro tyto účely jsou aplikovány různé esenciální oleje, jako je například tymiánový, eukalyptový olej, nebo přímo jejich složky. Příkladem jsou karvakrol a thymol, které jsou známy pro své antibakteriální a antioxidační vlastnosti. Esenciální oleje se dále využívají v potravinářském průmyslu pro prevenci mikrobiální kontaminace, čímž přispívají k prodloužení životnosti potravin.

Neionické poloxamery s označením P184, P188 a P407 jsou blokové kopolymery, které vykazují zajímavé micelizační vlastnosti, silně závislé na teplotě. Předkládaná diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací poloxamerních částic, a jejich následnou modifikací prostřednictvím vybraných aktivních látek. Cílem bylo sledovat výsledné fyzikálně-chemické vlastnosti s důrazem na stabilitu připravených systémů.

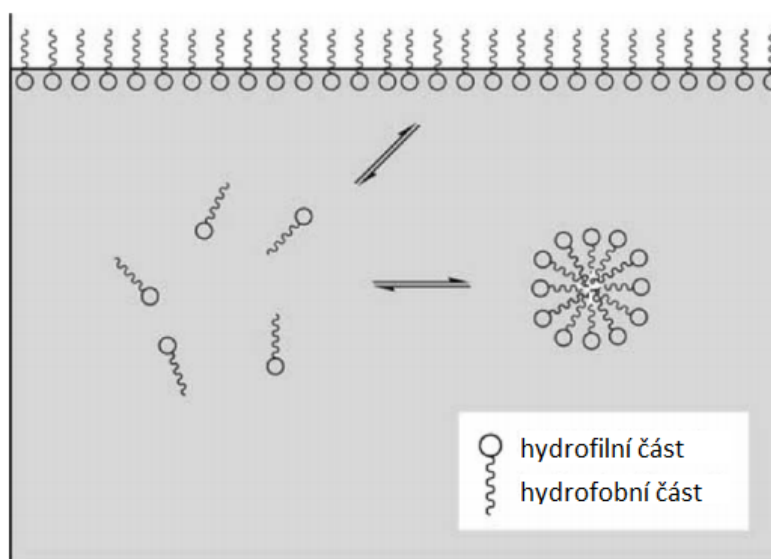
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 AMFIFILNÍ LÁTKY

Amfifilní látky jsou sloučeniny, které se skládají z polární (hydrofilní) a nepolární (hydrofobní) části. V literatuře se vyskytují také pod pojmy povrchově aktivní látky, surfaktanty nebo tenzidy. Tyto sloučeniny lze rozdělit na dva typy, a to ionické a neionické. Hydrofilní skupina kationických tenzidů vykazuje kladný náboj, zatímco hydrofilní část anionických tenzidů je nabitá záporně [1]. Vlastnosti amfifilních povrchově aktivních látek jsou charakterizovány hodnotami hydrofilně-lipofilní rovnováhy (HLB), podle níž lze definovat jejich aplikace. Povrchově aktivní látky s hodnotou HLB >10 jsou převážně hydrofilní a tvoří spíše emulze olej ve vodě (O/V), zatímco surfaktanty s hodnotou HLB <10 jsou hydrofobní a tvoří emulze voda v oleji (V/O). Látky s vysokou hodnotou HLB se převážně používají k tvorbě vodných roztoků [2].

1.1 Micely

Micely jsou supramolekulární útvary, tvořené různými organickými sloučeninami, pro něž je charakteristická amfifilní struktura s asymetrickým dipolárním charakterem a silným dipólovým momentem. Zvyšující se koncentrací sloučeniny v rozpouštědle se projevuje difilní charakter molekul, což způsobí asociaci do větších částic, tzv. premicelární struktury (dimery, trimery a malé agregáty). Z těchto struktur vznikají větší agregáty v oblasti kritické micelární koncentrace (CMC), tzv. micely (Obr. 1) [1].



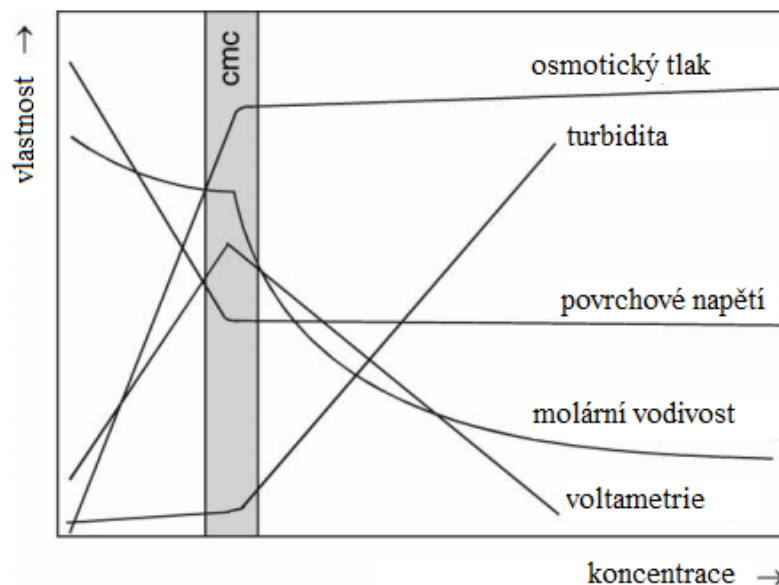
Obr. 1 Schématické znázornění dynamické rovnováhy mezi monomery v roztoku a monomery na rozhraní [1]

1.2 Kritická micelární koncentrace

Kritická micelární koncentrace (CMC) je prahová koncentrace, při které se začínají tvořit micely, a představuje významný charakteristický rys všech povrchově aktivních molekul. CMC závisí hlavně na složení sloučeniny, dále je ovlivněna vlastnostmi rozpouštědla, teplotou a přítomností další látek (hlavně silných elektrolytů). Hodnoty CMC se u většiny povrchově aktivních látek pohybují v rozmezí 10^{-5} až 10^{-3} mol/l. Tenzidy pod touto hodnotou jsou v roztoku ve formě monomerů. Hodnota CMC se zvyšuje s přítomností dvojných vazeb ve struktuře tenzidu, dále také rozvětvením uhlovodíkového řetězce, nebo polární substitucí v alkylovém řetězci. Na druhou stranu, substitucí alkylového řetězce benzenovým jádrem dojde ke snížení kritické micelární koncentrace. S teplotou se CMC může měnit v obou směrech, například u anionických tenzidů se hodnota CMC s rostoucí teplotou zvyšuje, a naopak u neionických snižuje [1], [3], [4].

1.2.1 Stanovení kritické micelární koncentrace

Metody pro stanovení CMC jsou založeny většinou na sledování změn charakteristických vlastností sloučenin, ke kterým dochází, pokud se v roztoku začnou tvořit micely. Postupů pro stanovení CMC existuje celá řada a lze je rozdělit do dvou skupin, na přímé a nepřímé měření. Při přímém měření je pozorována změna některé vlastnosti roztoku sloučeniny vytvářející micely s její rostoucí koncentrací. Změna směrnice či diskontinuity v závislosti na koncentraci značí hodnotu CMC. Mezi přímé metody patří měření povrchového napětí, elektrické vodivosti, osmotického tlaku, indexu lomu a viskozity. U nepřímého měření je pozorována změna některé vlastnosti jiné látky přítomné v roztoku sloučeniny vytvářející micely, k níž dochází se zvyšující se koncentrací této sloučeniny. Jedná se zejména o voltametrické a spektrofotometrické metody. Tyto metody jsou znázorněny na Obr. 2 [1].



Obr. 2 Metody používané pro stanovení CMC [1]

1.3 Význam micel

Povrchově aktivní látky se nad CMC samy agregují za vzniku micel s hydrofobním jádrem a hydrofilním povrchem. Do hydrofobního jádra se lépe solubilizují aktivní látky, jako např. léčiva, čímž se zvyšuje jejich rozpustnost. Léčivo může být solubilizováno v hydrofobním jádru nebo na rozhraní těchto struktur. Místo solubilizace léčiva závisí na jeho hydrofobicitě a interakci s povrchově aktivní látkou nebo s kosurfaktantem [2].

1.3.1 Směsné micely

Směsi tenzidů jsou běžně využívány v mnoha praktických aplikacích, jelikož díky synergickému účinku poskytují lepší detergenční vlastnosti. Směsné micely jsou navíc méně dráždivé vůči pokožce, což je výhodné pro kosmetický průmysl. Podobně jako v případě jednoduchých micel, dochází při tvorbě směsných agregátů ke změnám fyzikálně-chemických vlastností, které mohou být monitorovány prostřednictvím vhodné experimentální metody.

U směsí tenzidů může docházet jak k ideálnímu, tak neideálnímu míchání. K posouzení míry (ne)ideálnosti směsi je využíván parametr β , odvozený z Hollandovy a Rubinghovy teorie [5], [6].

Parametr β lze vypočítat z hodnoty kritické micelární koncentrace CMC^* , která se získá experimentálním stanovením nebo z teoretických hodnot. K tomu účelu lze využít Clintonův vztah (Rovnice 1).

$$\frac{1}{CMC^*} = \frac{X_1}{CMC_1} + \frac{X_2}{CMC_2} \quad (1)$$

Kde CMC^* je kritická micelární koncentrace směsných micel, X_1 a X_2 jsou molární frakce tenzidu 1 a 2, CMC_1 a CMC_2 jsou hodnoty kritické micelární koncentrace tenzidu 1 a 2 [7].

Složení směsné micely a molární zlomek x_M tenzidu 1 lze pak vypočítat pomocí Rubinghovy teorie (2).

$$\frac{x_M^2 \cdot \ln \frac{CMC^* \cdot x}{CMC_1 \cdot x_M}}{(1 - x_M)^2 \cdot \ln \frac{CMC^* \cdot (1 - x)}{CMC_2 \cdot (1 - x_M)}} = 1 \quad (2)$$

Kde CMC^* je kritická micelární koncentrace směsi, CMC_1 a CMC_2 jsou kritické micelární koncentrace jednotlivých tenzidů, x_M je molární zlomek tenzidu 1 ve směsné micelle a x je molární zlomek tenzidu 1 ve směsi. Následně parametr β se vypočítá pomocí rovnice (3).

$$\beta = \frac{\ln \frac{CMC^* \cdot x}{CMC_1 \cdot x_M}}{(1 - x_M)^2} \quad (3)$$

Kde symboly jsou totožné s předchozí rovnicí [8], [9], [10].

1.4 Gibbsova energie micelizace

Gibbsova energie micelizace ΔG_m^0 může být vypočítána z rovnice (4):

$$\Delta G_m^0 = -RT \ln K_m \quad (4)$$

kde R je univerzální plynová konstanta, T je termodynamická teplota a K_m je rovnovážná konstanta.

Rovnovážnou konstantu lze vypočítat z rovnice (6) za předpokladu existence rovnováhy v micelárním systému, který je popsán rovnicí (5):

$$nS \leftrightarrow S_n \quad (5)$$

kde S je neasociovaná jednotka, n je počet jednotek a S_n je asociovaná jednotka.

$$K_m = \frac{[S_n]}{[S]^n} \quad (6)$$

kde K_m je rovnovážná konstanta, $[S_n]$ je koncentrace micel a $[S]$ je koncentrace tenzidu [11], [12], [13].

Rovnici Gibbsovy energie (4) lze redukovat na jednodušší tvar, pokud je n dostatečně velké:

$$\Delta G_m^0 = RT x_{cmc} \quad (7)$$

kde x_{cmc} je molární zlomek monomeru při CMC vyjádřený rovnicí:

$$x_{cmc} = \frac{n_s}{n_s + n_{H_2O}} \quad (8)$$

kde n_s a n_{H_2O} vyjadřují počet molů tenzidu a vody v systému [14], [15].

1.5 Chování na rozhraní

Vlastnosti povrchově aktivních látek v roztoku jsou dány jejich tendencí minimalizovat kontakt svých hydrofobních skupin a vodou. To je dosaženo adsorpcí na rozhraní a asociací v roztoku. Gibbsova rovnice (9) vyjadřuje termodynamický základ pro adsorpci na rozhraní a poskytuje kvantitativní vztah mezi aktivitou molekul na povrchu nebo rozhraní a molekulami v hromadném roztoku.

$$dy = - \sum \Gamma_i d\mu_i \quad (9)$$

kde dy je změna povrchového napětí rozpouštědla, Γ je přebytek látky i na rozhraní a $d\mu_i$ je změna chemického potenciálu. Povrchový nadbytek na jednotku plochy se označuje jako Gibbsova adsorpce nebo jako adsorpční hustota. Povrchový nadbytek může být buď kladný, nebo záporný. Pokud je rozpouštěná látka z nějakého důvodu vylučována či odpuzována z rozhraní jedná se o negativní adsorpci na rozhraní a vede ke zvýšení povrchového napětí. Naopak složka, která se adsorbuje na rozhraní pozitivně, vede ke snížení povrchového napětí [14].

Z rovnice změny chemického potenciálu rozpouštěné látky na koncentraci:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \cdot \ln c_i \quad (10)$$

a jelikož platí:

$$d\mu = RT \cdot d(\ln c) \quad RT \cdot dc/c \quad (11)$$

lze odvodit rovnici Gibbsovy adsorpční izotermy (12) [13].

$$\Gamma = -\frac{c}{RT} \cdot \frac{dy}{dc} \quad (12)$$

Pokud roztoky obsahují pouze jednu rozpuštěnou látku, lze Gibbsovu rovnici psát ve tvaru:

$$dy = -RT(\Gamma_0 d\ln a_0 + \Gamma_1 d\ln a_1) \quad (13)$$

kde index 0 představuje rozpouštědlo a index 1 rozpuštěnou látku.

Za předpokladu, že $\Gamma_0 = 0$, lze Gibbsovu rovnici upravit na tvar [14].

$$dy = -RT \Gamma_1 d\ln c_1 \quad (14)$$

Koncentraci adsorbátu na rozhraní a jeho koncentraci v kapalně fázi lze vyjádřit pomocí adsorpční izotermy. Pokud je známa povrchová plocha na jednotku hmotnosti pevného adsorbentu a_s [cm²/g], lze koncentraci povrchově aktivní látky na rozhraní Γ_1 [mol/cm²] vypočítat z rovnice (15):

$$\Gamma_1 = \frac{\Delta C_1 V}{a_s \cdot m} \quad (15)$$

kde ΔC_1 je změna molární koncentrace povrchově aktivní látky před a po adsorpci, V je objem kapaliny [l]. Poté můžeme povrchovou plochu adsorbentu připadající na jednu molekulu povrchově aktivní látky a_1^s , která je vyjádřena jako 1 Å², vypočítat z rovnice:

$$a_1^s = \frac{10^{16}}{N\Gamma_1} \quad (16)$$

kde N je Avogadrova konstanta [10].

2 POLYMERNÍ AMFIFILNÍ LÁTKY

2.1 Polymerní micely

Polymerní micely vznikají vlastní agregací amfifilních kopolymerů, složených z hydrofilních a hydrofobních řetězců, jako jsou poloxamery a poloxaminy nebo roubované kopolymery s různou hydrofobicitou. Tyto micely mají dvojfázovou strukturu s kulovým vnitřním jádrem tvořeným hydrofobními bloky a vnějším obalem tvořeným hydrofilními jednotkami. Jedná se o částice s velikostí v nano rozměrech, a to v rozmezí 10 až 200 nm, které se, podobně jako v případě klasických amfifilních sloučenin, tvoří nad kritickou micelární koncentrací. Pokud se koncentrace polymeru pohybuje nad CMC, vytvořené micely jsou termodynamicky stabilní, v opačném případě se micely rozpadají v závislosti na amfifilní struktuře a interakcích mezi řetězci.

Existují různé typy polymerních micel v závislosti na struktuře použitého amfifilního kopolymeru a na vlastnostech roztoku (koncentrace polymeru, typ rozpouštědla, pH, iontová síla, teplota). Lze získat rozmanité struktury micel, u poloxamerů a poloxaminů kromě uvedených vlastností ovlivní tvar micely délka bloku PEO (poly(ethylenoxid)) a PPO (poly(propylenoxid)). Polymery s delšími hydrofilními bloky většinou tvoří sférické micely. Při vyšších koncentracích a teplotách se typicky tvoří lamelární struktury obsahující delší hydrofobní bloky, podobné struktury mohou také tvořit tyčinkovité nebo polymerní vezikuly (tzv. polymerzomy). Trojblokové kopolymery tvoří polymerní micely, které jsou podobné květu a jsou tvořeny malými hydrofobními konci a dlouhým hydrofilním řetězcem [16].

2.2 Charakterizace polymerních roztoků a micel

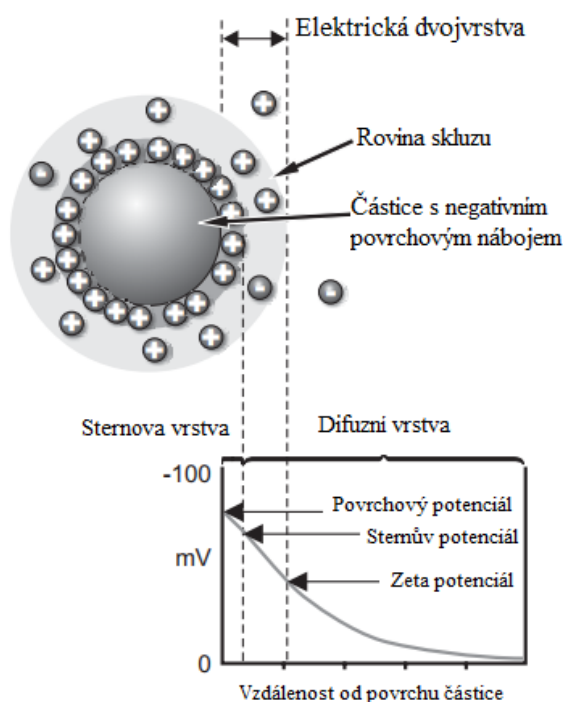
2.2.1 Velikost částic

Velikost polymerních micel lze měřit pomocí dynamického rozptylu světla (DLS – Dynamic Light Scattering), také známého pod pojmem fotonová korelační spektroskopie. Jedná se o efektivní metodu používanou ke stanovení velikosti, distribuce velikosti a tvaru částic v disperzních systémech na základě Brownova pohybu a Dopplerova posunu indukovaného laserovým paprskem. Je známo, že v důsledku Brownova pohybu, který je způsoben následnou kolizí s molekulami kapaliny, která obklopuje částice, dochází k neustálému pohybu částic. Jakmile je suspenze částic v Brownově pohybu excitována monochromatickým laserovým paprskem, změní se vlnová délka přicházejícího světla po dopadu na pohybující se částice, což vytváří Dopplerovský posun, tedy drobnou změnu

frekvence rozptýleného světla ve srovnání se světlem nerozptýleným. Tato změna poskytuje informace o velikosti, distribuci, tvaru a struktuře částic. Světlo rozptýlené malými částicemi kolísá rychle s malým Dopplerovým posunem, zatímco velkými částicemi se světlo šíří pomalu a vykazuje velký Dopplerův posun. Mezi další metody stanovení velikosti částic patří transmisní elektronová mikroskopie (TEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM), které jsou přesnější než DLS. Ovšem dynamický rozptyl světla má výhodu nízké ceny, flexibility, snadné proveditelnosti a údržby [17], [18], [19].

2.2.2 Zeta potenciál

Zeta potenciál je základní parametr charakterizující vlastnosti povrchového náboje rozhraní. Každá částice je obklopena elektrickou dvojvrstvou. Ve vnitřní Sternově vrstvě jsou ionty silně vázané, zatímco vnější difuzní vrstva je oblast, obsahující volněji vázané ionty. V difuzní vrstvě existuje pomyslná hranice, uvnitř které ionty a částice tvoří stabilní jednotku. Hranice mezi pohybujícími a nepohybujícími se částicemi a ionty se nazývá rovina nebo mez skluzu a potenciál existující na této hranici, se nazývá zeta potenciál (Obr. 3). Ten lze měřit pomocí elektrochemických jevů, jako je například elektroforéza [18].



Obr. 3 Schématické znázornění elektrostatického potenciálu [18]

Mezi faktory, které ovlivňují hodnotu zeta potenciálu, se řadí iontová síla, koncentrace, teplota a v neposlední řadě hodnota pH. Isoelektrický bod představuje hodnotu pH, při které je částice neutrální a systém je nejméně stabilní. Zeta potenciál úzce souvisí se stabilitou disperzních soustav. Je známo, že systémy s vysokým zeta potenciálem jsou elektricky stabilní, zatímco částice s nízkým zeta potenciálem mají tendenci koagulovat nebo flokulovat, což může vést k horší fyzikální stabilitě. Za stabilní disperze jsou obecně považovány ty, jejichž částice mají zeta potenciál buď větší než +30 mV nebo menší než -30 mV [18], [20].

3 AKTIVNÍ LÁTKY PRO INKORPORACI DO MICEL

3.1 Léčiva

Léčiva jsou často inkorporována do jádra polymerních micel, a to prostřednictvím chemické konjugace nebo metodou fyzikální. Inkorporace léčiva do vnějšího obalu se obvykle neprovádí, protože molekuly léčiva, které jsou většinou hydrofobní, by mohly s tímto obalem interagovat a způsobit tak nežádoucí tvorbu agregátů. K zajištění účinného dopravení léčiva je také důležitá minimalizace hydrofobních interakcí mezi nosiči léčiv a složkami biologického systému (proteiny, buňky), které mohou výrazně snížit transport prostřednictvím intra nebo intercelulárních cest, na nichž je založen účinek zvýšené permeability a retence. Vnější obal micely má funkci ochranného štítu a slouží k prevenci proti hydrofobním interakcím, ke kterým by mohlo dojít v případě inkorporace léčiva do vnější vrstvy. Mezi faktory, které ovlivňují inkorporaci léčiv do micel, patří kapacita micelárního nosiče, dále kompatibilita mezi aktivní látkou a nosným materiálem. Stabilita a degradace micel ve vodném médiu také ovlivňuje stupeň inkorporace a následné podmínky uvolňování. Dalším důležitým parametrem je délka a charakter bloků tvořících jádro a obal. Čím delší je hydrofobní část, tím větší je velikost jádra a jeho schopnost pojmout hydrofobní léčivo. Naopak větší zastoupení hydrofilní části způsobí zvýšení CMC, a snížení množství léčiva zachycené v micelách. Mezi další faktory ovlivňující účinnost inkorporace léčiva do polymerních micel, patří molekulová hmotnost kopolymeru, jeho koncentrace, povaha a koncentrace léčiva a také metoda přípravy bioaktivního polymerního micelárního systému. Polymerní micely využívané pro transport léčivých látek bývají často na bázi směsí amfifilních blokových kopolymerů, jako jsou například polyethylenglykol-poly- ϵ -kaprolakton (PEG-PCL) o různých molekulových hmotnostech (Tabulka 1). Z léčiv jsou uvedeny protizánětlivé nebo protinádorové látky, jako je například indometacin, paklitaxel nebo cyklosporin [21], [22], [23].

Tabulka 1. Příklady polymerních micel s inkorporovanými léčivými látkami [21], [22]

Polymery	Léčivo	Způsob přípravy
Chitosan-Pluronic	Indometacin	Přímé rozpuštění
Monomethoxy PEG-PCL MPEG-PCL	Honokiol	
Poloxamine T1107 (Tetronic)	Triklosan	
PEO-b-PCL	Kurkumin	Odpaření rozpouštědla
MPEG ₅₀₀₀ -PCL ₅₀₀₀ MPEG ₅₀₀₀ -PCL ₁₃₀₀₀ MPEG ₅₀₀₀ -PCL ₂₄₀₀₀	Cyklosporin s	
PEG ₅₀₀₀ -PCL ₅₀₀₀ PEG ₅₀₀₀ -PCL ₂₄₀₀₀	Kurkubitan B	
PEG ₅₀₀₀ -PCL ₅₀₀₀ PEG ₅₀₀₀ -PCL ₂₄₀₀₀	Kurkibitan I	
PCL-b-PEO	Fluorescein-5-carbonyl azide diacetate, 17 β – estradiol	Dialýza
PEG ₁₉₈₀ -PCL ₁₃₆₈ PEG ₁₉₈₀ -PCL ₂₆₂₂ PEG ₁₉₈₀ -PCL ₁₇₃₂₈	17 β – estradiol	
PEG ₅₀₀₀ -PBCL ₄₄₇₀	Paklitaxel	
PEG ₅₀₀₀ -PCL ₅₀₀₀	Saglopin	Sonifikace

3.2 Esenciální oleje

Esenciální oleje jsou těkavé, čiré a zřídka zbarvené kapaliny, které jsou rozpustné v tucích a v organických rozpouštědlech s obecně nižší hustotou než voda. Mohou být syntetizovány všemi rostlinnými orgány, tj. pupeny, květy, listy, stonky, semeny, plody a dalšími. Existuje

několik způsobů extrakce éterických olejů, mezi které patří použití kapalného oxidu uhličitého nebo mikrovln, nízkotlaké nebo vysokotlaké destilace s použitím vroucí vody nebo horké páry. Podle definice Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) je výraz „éterický olej“ vyhrazen pro produkt získaný z rostlinných surovin, buď destilací vodou nebo párou, nebo z epikarpu citrusových plodů mechanickým způsobem nebo suchou destilací (ISO 9235, 1997). Esenciální oleje pro lékařské účely musí navíc vyhovovat národním nebo mezinárodním lékopisům. Esenciální oleje jsou obecně komplexní směsi těkavých organických sloučenin produkovaných jako sekundární metabolity v rostlinách, které zahrnují uhlovodíky (terpeny a seskviterpeny) a kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, estery, étery, aldehydy, ketony, laktony a fenoly). Obecně esenciální oleje obsahují 20 – 60 složek až do více než 100 jednotlivých látek v poměrně různých koncentracích a dvě nebo tři hlavní složky jsou zastoupeny ve vysokých koncentracích (20 – 70 %) ve srovnání s ostatními složkami přítomnými ve stopových množstvích. Tyto hlavní složky určují biologické vlastnosti éterických olejů. Složky zahrnují různé skupiny odlišného biosyntetického původu. Hlavní skupinu tvoří terpenoidy, fenylypropanoidy a alifatické uhlovodíkové deriváty s krátkým řetězcem, které se všechny vyznačují nízkou molekulovou hmotností [24].

Esenciální oleje se běžně používají v parfumerii, kosmetice, potravinářství nebo v zemědělství díky jejich aromatickým vlastnostem. Aroma je nejdůležitějším faktorem pro aplikaci éterických olejů. Některé éterické oleje mají navíc i biologické účinky, které lze využít při přípravě farmaceutických výrobků a funkčních potravin. Vlastnosti těchto olejů se mění v závislosti na jejich původu a složení. Některé oleje vykazují antioxidační aktivitu a působí tedy v boji proti volným radikálům, jiné jsou známy díky svým protizánětlivým a antimikrobiálním vlastnostem. Inkorporace aktivních látek, tedy i esenciálních olejů, do micel slouží také jako prevence proti odpařování, oxidaci a dalším degradačním mechanismům způsobeným teplem, světlem a vlhkostí. V poslední době jsou intenzivně studovány systémy a technologie s řízeným uvolňováním, jejichž význam spočívá v dodávání aktivních látek kontrolovanou rychlostí, což vede ke zvýšené účinnosti a bezpečnosti samotné aplikace. Konkrétní vlastnosti polymerní sítě, jako je délka řetězce, flexibilita a mobilita, absorpce vody a bobtnání nebo potenciální interakce mezi polymerem a účinnou látkou, ovlivní rychlost difúze napříč polymerní maticí, a tedy uvolnění oleje. Nejběžnější metodou enkapsulace esenciálních olejů je koacervace.

Pro kosmetické účely se nejčastěji enkapsuluje citronový, tymiánový, vanilkový, eukalyptový, mentolový a pomerančový esenciální olej. Ve farmacii a potravinářství se využívá mentolový, mátový, pomerančový, rozmarýnový, skořicový a citronella esenciální olej [25], [26]. V další části budou stručně charakterizovány látky, které byly využity v experimentální části diplomové práce, a to olej tymiánový (a jeho nejvíce zastoupená složka thymol) a eukalyptový.

3.2.1 Eukalyptový olej

Eukalyptový olej je získáván z rostlin a keřů Blahovičnicku (*Eukalyptus spp.*), patří do čeledi Myrtaceae a pochází z Austrálie. Česky je nazýván eukalyptus, přičemž toto označení zahrnuje více než 700 druhů po celém světě. Hlavní složkou esenciálního oleje z eukalyptu je terpen 1,8 – cineol, také známý jako eukalyptol a množství této sloučeniny je závislé na konkrétním druhu. Koncentrace této sloučeniny, která má význam pro svou antimikrobiální aktivitu, se pohybuje mezi 44 % a 84 %. Olej z eukalyptu patří mezi 18 nejčastěji obchodovatelných esenciálních olejů na světě. Je často využíván jako přírodní přísada do potravin, léčiv a kosmetiky. Známými druhy jsou *Eukalyptus globulus* a *Eukalyptus radiata*, které se využívají pro své antiseptické, adstringentní, deodorační, dezinfekční a inhalační účinky. Dále mohou být aplikovány pro léčbu abscesů, artritidy, astmatu, bronchitidy, popálenin, chřipky a zánětlivých onemocnění [27].

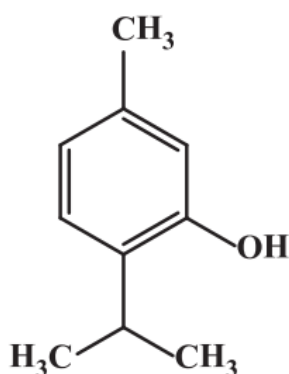
3.2.2 Tymiánový olej

Druhy tymiánu jsou známé aromatické byliny používané nejen jako koření, ale také pro léčbu různých nemocí. Tymiánový olej je nejčastěji získáván z rostliny rodu *Thymus vulgaris*, která pochází ze Středomoří. Tymiánový éterický olej obsahuje thymol, karvakrol, p - cymen, y – terpinen a linalool, kde thymol a karvakrol jsou přítomny v relativně vysokém procentu, a to 41,6 % a 7,9 %. Jedná se o fenolické sloučeniny, které stojí za antioxidační, antimikrobiální aktivitou a anestetickými vlastnostmi tymiánového oleje. Obsah jednotlivých složek se ovšem může výrazně měnit v závislosti na konkrétním druhu, lokalitě pěstování, klimatických podmínkách, skladování apod. Tymiánový olej bývá aplikován v lékařství pro různé indikace, jako je suchý kašel, bronchitida a zažívací potíže [28].

3.2.3 Thymol

Thymol (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) je izomerem karvakrolu a patří mezi terpenoidy. Thymol je jednou z fenolických sloučenin, která se přirozeně vyskytuje

v éterických olejích, a to *Thymus vulgaris* a *Origanum vulgare*. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) klasifikoval thymol jako látku obecně bezpečnou (GRAS, Generally Recognized as Safe) [29]. V lékařství je využíván v přípravcích proti bronchitidě a orálním infekcím. Vzhledem ke svým antiseptickým vlastnostem je také součástí ústních vod a zubních past. Navíc má thymol významné antivirové účinky proti HSV-1. Patří také mezi přírodní antimikrobiální činidla se schopností inhibovat jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie, včetně potenciálních patogenních kmenů *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*. Thymol a éterické oleje bohaté na thymol se osvědčily v lékařství, potravinářství, zemědělství a veterinárním lékařství [28], [30].



Obr. 4 Chemická struktura thymolu [31]

3.3 Vitaminy

Vitaminy mají antioxidační účinky a mohou chránit před řadou degenerativních onemocnění, včetně kardiovaskulárních chorob a některých typů rakoviny. Hlavními antioxidačními vitaminy jsou vitamin C, vitamin E a β – karoten [32].

3.3.1 Vitamin C

Vitamin C (kyselina askorbová) je známým ve vodě rozpustným antioxidačním činidlem, a to díky schopnosti vychytávat volné radikály produkované například určitými léky, chránit plicní tekutiny před poškozením způsobeným obzvláště nebezpečnými látkami znečišťujícími ovzduší, jako je O_3 a NO_2 , a také snižovat peroxidaci lipidů v cigaretovém kouři [33].

Vitamin C má řadu biologických, farmaceutických a dermatologických funkcí. Podporuje biosyntézu kolagenu, poskytuje foto ochranu, způsobuje redukci melaninu, zachycuje volné

radikály a zvyšuje imunitu. Jelikož je vitamin C nestabilní vůči vzduchu, světlu, teplu, kovovým iontům, kyslíku a snadno se rozkládá na biologicky neaktivní sloučeniny, jeho použití v kosmetice, dermatologii a léčivech je omezeno. Proto se vitamin C enkapsuluje do vhodné matrice, aby se zvýšila jeho stabilita [34].

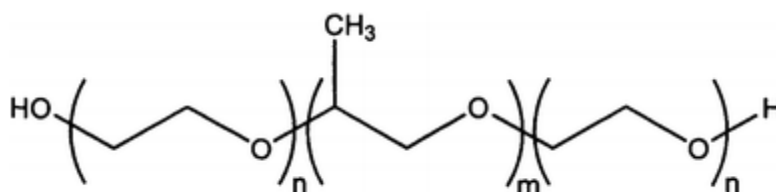
3.3.2 Vitamin E

Vitamin E jako nutraceutikum je nezbytným vitamínem pro lidské tělo, který zajišťuje správné fungování a stabilitu buněk a buněčných membrán. Přirozeně se nachází ve fazolích, celozrnných obilninách, rostlinných olejích a je široce používán ve funkčních potravinářských přídatných látkách, kosmetice a léčivech. Vitamin E má několik izomerů, včetně δ , γ , β , α – tokoferol a tokotrienol. Jejich aktivita a biologická dostupnost závisí na jejich struktuře. Z těchto izomerů je α – tokoferol nejvíce biologicky aktivní a má větší biologickou dostupnost než jiné formy. Vitamin E je v těle nejdůležitější přírodní antioxidant rozpustný v tucích, který posiluje imunitní systém a předchází koronárním srdečním onemocněním. Vitamin E ve formě α – tokoferolu chrání polynenasycené mastné kyseliny v buněčných membránách a snižuje lepivost krevních destiček v krvi. Také je to antioxidant rozpustný v tucích a jeho oxidovaná forma může být redukována kyselinou askorbovou. Zdroj vitaminu E z potravin není ale dostačující pro tělní potřeby. Využití jeho příznivých účinků je omezeno kvůli jeho nestabilitě vůči teplu, světlu a kyslíku, kde se přeměňuje na chinon prostřednictvím tvorby epoxidu. Navíc je vitamin E hydrofobně aktivní, což ztěžuje přímou dispergaci do vodné fáze. Enkapsulace vitaminu je nezbytná pro zvýšení rozpustnosti v potravě a buněčných membránách, pro lepší střevní absorpci a prevenci před nepříznivými účinky okolních podmínek a také před nepříznivými organoleptickými změnami v potravinách a nápojích. Pro enkapsulaci vitaminu E existuje mnoho dodávacích systémů v závislosti na nákladech, snadnosti použití a biokompatibilitě, jako jsou lipozomy, noizomy a další [35], [36].

4 CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH POLYMERNÍCH TENZIDŮ

4.1 Poloxamer 184

Poloxamer 184 (Obr. 5) známý také pod komerčními názvy Pluronic® L64 a Kolliphor® P184 je bezbarvá nebo téměř bezbarvá kapalina, snadno rozpustná ve vodě, také velmi snadno rozpustná v 96 % ethanolu, ale prakticky nerozpustná v etheru petrolejovém (50 °C až 70 °C). Poloxamer 184 má z dostupných poloxamerů nejvyšší detergenční aktivitu. Vzhledem k nízkému iritačnímu potenciálu pro kůži a sliznice se tento poloxamer používá hlavně jako čisticí prostředek v jemných pleťových přípravcích, jako jsou čisticí ubrousky pro odličení make-upu. Uplatňuje se také jako emulgátor pro emulze typu O/V. Základní fyzikálně-chemické vlastnosti P184 jsou uvedeny v Tabulce 2 [37], [38], [39].



Obr. 5 Chemický vzorec poloxameru 184 ($m = 26$, $n = 30$, molekulová hmotnost 2900 g/mol) [40]

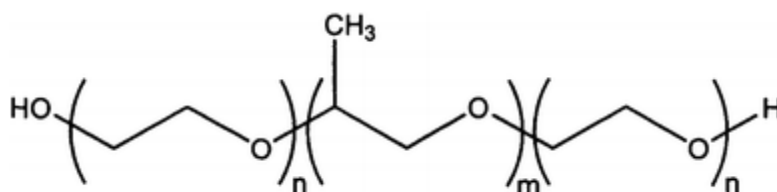
Tabulka 2. Vlastnosti poloxameru 184 [16], [37]

Molekulová hmotnost (g/mol)	2900
Počet EO jednotek	26,36
Počet PO jednotek	30
HLB	15
Bod zákalu (°C)	58
CMC (mol/l)	$4,8 \cdot 10^{-4}$
Povrchové napětí při 23 °C, 1 g/l (mN/m)	41
Viskozita při 23 °C, 60 rpm (mPa·s)	850

4.2 Poloxamer 188

Poloxamer 188 (Obr. 6) známý také pod obchodními názvy Pluronic® F68 a Kolliphor® P188 je bílý voskovitý prášek, také ve formě mikrokuliček nebo vloček. Je snadno rozpustný

ve vodě a v 96 % ethanolu a nerozpustný v petrolejovém etheru. Tento poloxamer má velmi dobré pěnicí vlastnosti, proto se používá hlavně ve sprchových gelech, mycích pěnách, holicích gelech. Také se využívá v přípravcích pro ústní hygienu, v zubních pastách a ústních vodách. Lze jej také aplikovat jako stabilizátor suspenzí, zlepšuje rozpustnost, absorpci a biologickou dostupnost formulací s obsahem omezeně rozpustných účinných látek. Poloxamer 188 se dále používá jako změkčovadlo, velmi dobrý solubilizátor éterických olejů, emulgátor i koemulgátor kosmetických emulzí a mikroemulzí. Vlastnosti poloxameru 188 jsou shrnuty v Tabulce 3 [16], [37], [41].



Obr. 6 Struktura poloxameru 188 ($m = 30$, $n = 160$,
molekulová hmotnost 8400 g/mol) [40]

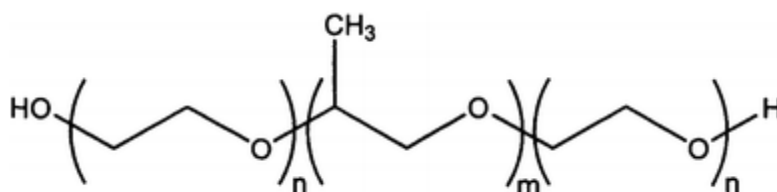
Tabulka 3. Vlastnosti poloxameru 188 [16], [37]

Molekulová hmotnost (g/mol)	8400
Počet EO jednotek	152,73
Počet PO jednotek	28,97
HLB	29
Bod zákalu (°C)	>100
CMC (mol/l)	$4,8 \cdot 10^{-4}$
Povrchové napětí při 23 °C, 1 g/l (mN/m)	52
Viskozita při 23 °C, 60 rpm (mPa·s)	1000

4.3 Poloxamer 407

Poloxamer 407 (Obr. 7), známý také pod ochrannou známkou Pluronic® F127 a obchodním názvem Kolliphor® P407, je neionický tříblokový kopolymer, který je tvořen hydrofobním zbytkem polyoxypropylenu mezi dvěma hydrofilními jednotkami polyoxyethylenu. Má formu bílého prášku, který je rozpustný ve vodě, v ethanolu, isopropanolu, ale je nerozpustný v minerálních olejích. Tento poloxamer má hlavní využití jako zahušťovadlo

a gelační činidlo, dále je využíván jako koemulgátor a přísada pro úpravu konzistence v krémech a kapalných emulzích. Dále bývá aplikován jako polymerní solubilizátor pro éterické oleje a další účinné látky ve farmaceutických přípravcích. Využívá se při zpracování pevných disperzí při míchání, granulaci taveniny, sprejovém sušení a vytlačování. Používá se jako stabilizátor pro topicky podávané suspenze, dále v zubních pastách a ústních vodách, kde se využívá zejména jeho schopnosti regulovat viskozitu. V procesech mokré granulace je Kolliphor® P407 vhodný jako látka podporující rozpouštění, lubrikační činidlo a smáčedlo. Z důvodu dobré solubilizační kapacity, nízké toxicity a také díky jeho kompatibilitě s biomolekulami a chemickými pomocnými látkami bývá tento poloxamer využíván pro výrobu hydrogelů. V následující Tabulce 4 jsou uvedeny vlastnosti poloxameru P407 [37], [42], [43].



Obr. 7 Struktura poloxameru 407 ($m = 67$, $n = 200$,
molekulová hmotnost 12 600 g/mol) [40]

Tabulka 4. Vlastnosti poloxameru 407 [16], [37]

Molekulová hmotnost (g/mol)	12600
Počet EO jednotek	200,45
Počet PO jednotek	65,17
HLB	22
Bod zákalu (°C)	>100
CMC (mol/l)	$2,8 \cdot 10^{-6}$
Povrchové napětí při 23 °C, 1 g/l (mN/m)	41
Viskozita při 23 °C, 60 rpm (mPa·s)	3100

5 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Systémy pro doručování aktivních látek podporují jejich řízené a cílené dodání na místo určení. Lidská kůže působí jako bariéra proti průniku exogenních molekul. Dodávací systémy jsou schopny zvýšit permeaci aktivní složky přes kožní vrstvy a regulovat její koncentraci v kůži. Z kosmetického hlediska je hlavním cílem udržet účinnou látku v povrchových vrstvách kůže a zabránit systémové absorpci.

Další výhodou těchto systémů je ochrana aktivních složek před vnějšími vlivy, jako je světlo, teplo a kyslík, čímž se zvyšuje stabilita produktu. Díky enkapsulaci aktivních látek do vhodného nosiče jsou také omezeny případné nežádoucí interakce s jinými molekulami přítomnými v matici produktu. Také mohou být zlepšeny některé reologické a senzorké vlastnosti produktu, což se příznivě projeví na následné manipulaci, použití a skladování. Prostřednictvím inkorporace do nosného materiálu lze také maskovat případné nežádoucí aroma [34].

V kosmetických přípravcích se lze setkat s různými typy systémů pro doručování aktivních látek, jako jsou například vezikulární systémy (lipozomy, niozomy, transferzomy), emulze (mikroemulze a nanoemulze) a částicové systémy (mikročástice a nanočástice) [44]. Jednou z metod přípravy doručovacích systémů, která nachází podstatné uplatnění v kosmetickém průmyslu, je mikroenkapsulace. Tato technika může být použita v kosmetických přípravcích, jako jsou sprchové a koupelové gely, pleťové vody a krémy, vlasové produkty, opalovací krémy, make-upy, parfémy, mýdla, zubní pasty a další. Prostřednictvím mikroenkapsulace mohou být účinné látky do pokožky dodány cíleně, bezpečně a efektivně [34].

V oblasti farmakologie byly vyvinuty systémy na bázi nanočástic aplikované k léčbě onkologických onemocnění. Nanočástice jsou koloidní částice o velikosti od 10 nm do 1000 nm, přičemž hlavním cílem při jejich vývoji jako nosného systému je možnost regulace velikosti částic, povrchových vlastností a zejména pak způsobu uvolňování farmakologicky účinných látek. Mezi výhody doručovacích systémů na bázi nanočástic patří také možnost inkorporovat a následně transportovat celou řadu terapeutických látek, jako jsou například menší molekuly (jak hydrofilní, tak hydrofobní), peptidy, proteiny anebo nukleové kyseliny. Inkorporované molekuly mohou být z nanonosičů uvolňovány kontrolovaně, v průběhu daného času, proces může být také vyvolán prostřednictvím nějakého podnětu jedinečného pro konkrétní místo dodání. Proteiny jsou skupinou přírodních molekul, které mají jedinečné

funkce a vysoký potenciál pro aplikace v biomedicínských vědách. Jsou považovány za ideální materiály pro přípravu nanočástic díky své amfifilitě, která jim umožňuje dobře interagovat jak s léčivem, tak s rozpouštědlem. Nanočástice odvozené z přírodních bílkovin jsou biologicky rozložitelné a vhodné pro nejrůznější povrchové úpravy, které usnadňují navázání léčiv a specifických ligand. Mezi proteiny, které mohou být použity pro přípravu nanočástic jako nosičů, lze zařadit zein, gliadin, albumin, želatinu, elastin, sójové (glycinin) a mléčné proteiny (kasein) [45].

Je známo, že hydrofobní léčiva vykazují nízkou rozpustnost v biologických tekutinách, což je hlavní omezení v orálním, parenterálním a transdermálním podáním. Z toho důvodu je pozornost věnována studiu inkorporace těchto látek do polymerních micel. Amfifilní blokové kopolymery na bázi poly(ethylenoxidu) a poly(propylenoxidu) jsou termoreaktivní materiály, které vykazují jedinečné agregační vlastnosti ve vodném médiu [46].

Chaudhari a kol. [47] se ve své studii zabýval solubilizací ve vodě slabě rozpustného léčiva Lamotriginu, a to prostřednictvím jak jednoduchých, tak smíšených polymerních micel typu Pluronic (Pluronic F68, Pluronic L81). Micelární formulace byly připraveny s použitím různých poměrů léčivo:polymer. Výsledky prokázaly, že solubilizace Lamotriginu byla usnadněna se vzrůstem koncentrace blokových kopolymerů a teploty. Naopak žádné zásadní zvýšení nebylo pozorováno při přidavku soli. Smíšené micely vykazovaly poměrně vysokou účinnost inkorporace, kapacitu plnění a řízené uvolňování modelového léčiva v porovnání s jednoduchými micelami.

Ren a kol. [48] studovali uvolňování methotrexátu, což je známé cytostatikum využívané v medicíně pro léčbu nádorů, ze systému na bázi poloxameru. Díky kombinaci fyzikálního ukotvení a chemické konjugace docházelo ke dvoufázovému uvolňování aktivní látky, kdy po relativně rychlém uvolnění (během 6 až 7 hodin) následoval pomalejší řízený proces uvolnění konjugovaného methotrexátu. Bylo tedy dosaženo prodlouženého času působení léčiva a došlo i ke zlepšení jeho biodostupnosti.

Ve studii [49] autoři zkoumali polymerní micely složené z Poloxameru P407 a Pluronicu P123 jako potenciální nosiče pro orální podání antiretrovirového (hydrofobního) léčiva Nevirapinu. Tento lék slouží pro léčbu AIDS, ale jeho užívání je doprovázeno velmi nepříjemnými vedlejšími účinky. Z tohoto důvodu je předmětem výzkumu tvorba takového doručovacího systému, který by posílil klinický potenciál léku. Vzájemné interakce jednotlivých složek smíšených micel byly charakterizovány pomocí infračervené spektroskopie (FTIR), diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a rentgenových

difrakčních studií (XRD). Výsledky prokázaly, že byly získány malé částice s dostatečně vysokou hodnotou zeta potenciálu, která zajišťuje stabilitu a prevenci vůči agregaci. Bylo také zjištěno, že Nevirapin má dostatečnou kompatibilitu s pomocnými látkami. Připravené systémy prokázaly vysokou enkapsulační účinnost zachycení a řízené uvolňování testovaného léčiva i při nižší koncentraci polymeru, což je předurčuje pro zařazení do stávající antiretrovirové terapie.

V práci autorů Minnelli a kol. [50] se zabývali inkorporací epigallocatechin-3-gallatu (EGCG) do anionických lipozomů připravených z derivátů phosphoethanolaminu, phosphocholinu a cholesterolu, za účelem ochrany molekuly a zvýšení její efektivity dodání na místo určení. EGCG je polyfenolický katechin ze zeleného čaje, který má značnou biologickou aktivitu u degenerativních procesů souvisejících s věkem, kde hraje hlavní roli oxidační stres. Přídavek poloxameru P407 zásadně zvýšil stabilitu připravené nanodisperze, což bylo prokázáno pomocí dynamického rozptylu světla. Výsledky ukázaly, že lipozomální částice s enkapsulovaným EGCG a přídavkem P407 vykazoval vynikající antioxidační aktivitu ve srovnání s volným EGCG a představují tak perspektivní systém pro léčbu onemocnění způsobených oxidačním stresem.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍLE PRÁCE

Cíle této diplomové práce byly:

- příprava vodných roztoků poloxamerů a poloxamerů s přídavkem aktivních látek,
- studium fyzikálně-chemických a stabilitních vlastností připravených systémů,
- diskuze dosažených výsledků.

7 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POSTUPY

7.1 Použité chemikálie

Poloxamer P184, Aldrich

Poloxamer P188, Sigma

Poloxamer P407, Sigma

Thymol, Sigma

Fosfátový pufr (pH 7), Penta

Ftalátový pufr (pH 4), Penta

Tymiánový olej, Nobilis Tilia

Eukalyptový olej, Nobilis Tilia

Carbopolový gel, Fagron

Mueller Hinton Agar (MHA)

Mikroorganismy: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Escherichia coli CCM 3954

7.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy Sartorius Basic 110 S

Magnetické míchadlo Lavat Chotutice

Magnetické míchadlo MAGNETIC STIRRER HI 190 M

Ultrazvuková lázeň KRAINTEK K10

Tenziometr Easy Dyne Krüss

Bateriový pH metr CPH 51 s kombinovanou pH elektrodou HC 103

Zetasizer Nano ZS Malvern

Viskozimetr BROOKFIELD DV – III ULTRA se spindlem SC4-18

Spektrofotometr photoLab 6600 UV-VIS

Mikropipety Eppendorf reaserch plus

Parafilm M Laboratory Seal film

Laboratorní sklo (kádinky, odměrné baňky, pipety, odměrné válce, tyčinky, lžičky)

7.3 Příprava roztoků poloxamerů

Byly připraveny 1 hm. %, 2 hm. % a 5 hm. % vodné roztoky poloxamerů tak, že bylo naváženo vypočtené množství poloxameru s přesností na 0,0001 g. Tato navážka byla rozpuštěna ve vypočítaném množství destilované vody na magnetickém míchadle při 500 rpm (do 10 minut). Pro stanovení bodu zákalu byl připraven 1 hm. % vodný roztok daného poloxameru stejným způsobem jako u stanovení CMC.

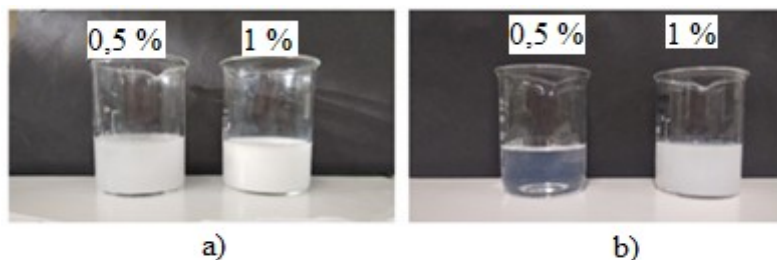
7.4 Příprava roztoků poloxamerů s aktivní látkou

Do zásobních roztoků poloxamerů připravených dle kapitoly 7.3 byly přidány aktivní látky o koncentracích 0,5 hm. % a 1 hm. %. Vzorky byly homogenizovány na magnetickém míchadle při 500 rpm nebo vloženy do ultrazvuku vyhřátého na 40 °C. Podmínky přípravy jednotlivých roztoků jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tabulka 5. Podmínky přípravy roztoků

	P184	P188	P407
0,5 hm. % tymiánový olej	míchadlo (500 rpm) 60 min	míchadlo (500 rpm) 60 až 90 min + UTZ (40 °C) 15 min	míchadlo (500 rpm)
1 hm. % tymiánový olej			míchadlo (500 rpm) 60 až 90 min + UTZ (40 °C) 15 min
0,5 hm. % eukalyptový olej	míchadlo (500 rpm) 60 min	míchadlo (500 rpm) 60 min + UTZ (40 °C) 15 min	míchadlo (500 rpm) 60 min
1 hm. % eukalyptový olej			míchadlo (500 rpm) 60 min + UTZ (40 °C) 15 min
0,5 hm. % thymol	míchadlo (500 rpm) 90 min + UTZ (40 °C) 30 min	míchadlo (500 rpm) 60 až 90 min + UTZ (40 °C) 30 min	míchadlo (500 rpm) 120 min + UTZ (40 °C) 60 min
1 hm. % thymol	-		

Vzorky po přípravě byly průsvitné nebo mléčné, rozpustnost závisela na typu a koncentraci poloxameru i aktivní látky (příklad na Obr. 8). Horší homogenita byla pozorována u systémů 1%ních poloxamerů s 1 % aktivní látky, konkrétně pak vzorek P184 s thymolem nepodařilo zhomogenizovat ani po delším čase míchání/působení UTZ. Z toho důvodu nebylo možno u tohoto roztoku měřit požadované charakteristiky.



Obr. 8 a) Vzorky 2 hm. % P184 s 0,5 a 1 hm. % thymolem
 b) Vzorky 5 hm. % P184 s 0,5 a 1 hm. % eukalyptovým olejem

7.5 Stanovení kritické micelární koncentrace jednotlivých poloxamerů

Pro určení kritické micelární koncentrace bylo připraveno 100 ml zásobního roztoku poloxameru o koncentraci 5 hm. % navážením vypočítaného množství s přesností na 0,0001 g. Tato navážka byla rozpuštěna v destilované vodě a míchána na magnetickém míchadle (500 rpm max. 10 minut). Po rozpuštění byl vzorek kvantitativně převeden do odměrné baňky a destilovanou vodou doplněn po rysku.

Kritická micelární koncentrace byla stanovena měřením povrchového napětí na tenziometru (Obr. 9), za použití metody Wilhelmyho destičky při teplotě 25 °C a 45 °C. Ze zásobního roztoku daného poloxameru (5 hm. %) byly připraveny pracovní roztoky do 50 ml odměrných baněk, a to o koncentracích od 0,01 do 1,5 hm. % dle zředovací rovnice (17). Následně byly jednotlivé roztoky přelity do misek tenziometru vytemperované na požadovanou teplotu a po ustálení bylo změřeno povrchové napětí (hodnoty byly automaticky přístrojem průměrovány z 5 měření). Hodnoty kritické micelární koncentrace byly následně vyhodnoceny vždy ze dvou sérií měření. Dále bylo změřeno povrchové napětí u směsí tenzidů, a to u 1 hm. % poloxamerů, vždy v poměru 1:1.

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (17)$$

Kde

c_1 koncentrace zásobního roztoku [mol/l]

V_1 objem zásobního roztoku [l]

c_2 koncentrace pracovního roztoku [mol/l]

V_2 objem pracovního roztoku [l]



Obr. 9 Tenziometr EasyDyne, Krüss

7.6 Stanovení bodu zákalu

Před měřením byl připraven vodný roztok daného poloxameru o koncentraci 1 hm. % navážením vypočítaného množství s přesností na 0,0001 g. Tato navážka byla rozpuštěna v destilované vodě a míchána na magnetickém míchadle (500 rpm, max 10 minut). Po rozpuštění byl vzorek kvantitativně převeden do odměrné baňky a destilovanou vodou doplněn po rysku.

Takto připravený vzorek byl nalit do 1 třetiny skleněné zkumavky, do které byl vložen teploměr. Zkumavka byla vložena do vodní lázně, která byla postupně zahřívána a následně byla sledována teplota vytvoření zákalu. Hodnoty bodu zákalu jsou průměrem ze dvou měření.

7.7 Měření viskozity

Pro měření viskozity byly použity vzorky poloxamerů a poloxamerů s aktivní látkou připravené dle postupu v kapitole 7.3 a 7.4. Do nádoby viskozimetru bylo nalito přibližně 8 ml vzorku a nádoba byla vložena do kalibračního pouzdra, k němuž bylo připevněno teplotní čidlo. Toto měření bylo prováděno na přístroji Brookfield (Obr. 10) při 50 rpm za použití spindlu SC4-18 při teplotě 25 °C. Hodnoty viskozity jsou průměrem ze dvou měření.



Obr. 10 Viskozimetr Brookfield

7.8 Měření velikosti částic pomocí DLS

Připravené roztoky poloxamerů a poloxamerů s aktivní látkou byly zředěny filtrovanou destilovanou vodou připravenou pomocí filtru o velikosti pórů $0,45 \mu\text{m}$ ($0,5 \text{ ml}$ vzorku a 1 ml filtrované destilované vody). Takto připravené vzorky byly nality do kyvety typu DTS0012, která byla umístěna do přístroje Zetasizer ZS Malvern a byla zjištěna distribuce a průměrná hodnota velikosti částic. Měření vzorku probíhalo při teplotě $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. Přístroj automaticky vyhodnotil 3 hodnoty, které byly následně zprůměrovány. Výsledky jsou pak průměrem ze dvou sérií těchto měření.

7.9 Měření stability částic pomocí zeta potenciálu

Pro měření zeta potenciálu byly roztoky poloxamerů a poloxamerů s aktivní látkou také zředěny filtrovanou destilovanou vodou ($6 \mu\text{l}$ vzorku a 3 ml filtrované destilované vody). Takto zředěné vzorky byly pomocí injekční stříkačky naplněny do kyvety typu DTS1070 pro měření zeta potenciálu, která byla umístěna do přístroje Zetasizer ZS Malvern a hodnoty byly z přístroje automaticky vyhodnoceny jako průměr ze tří měření. Výsledky jsou pak průměrem ze dvou sérií těchto měření. Měření probíhalo při teplotě $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$.

Dále byla u vzorků sledována jejich stabilita, a to měřením velikosti částic a zeta potenciálu po 7, resp. 60 dnech stání při $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ a $4 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. Měření probíhalo stejně jako v kapitolách 7.8 a 7.9.

7.10 Stanovení maximální aditivní koncentrace

Pro stanovení maximální aditivní koncentrace (MAC) byly připraveny zásobní roztoky poloxamerů o koncentraci 2 hm. % tak, že bylo naváženo vypočtené množství poloxameru s přesností na 0,0001 g. Tato navážka byla rozpuštěna ve vypočítaném množství destilované vody a směs byla míchána na magnetickém míchadle při 500 rpm při laboratorní teplotě. Do těchto roztoků byl následně přidán tymiánový olej o koncentraci 1 hm. %, směs byla dále míchána na magnetickém míchadle při 500 rpm 1 hodinu a dále pomocí ultrazvukové lázně (40 °C, 30 minut). Z těchto zásobních roztoků byly připraveny pracovní roztoky v rozsahu koncentrací aktivní látky 0,01 až 0,5 hm. %. Následně byla měřena absorbance spektrofotometricky při vlnové délce 630 nm.

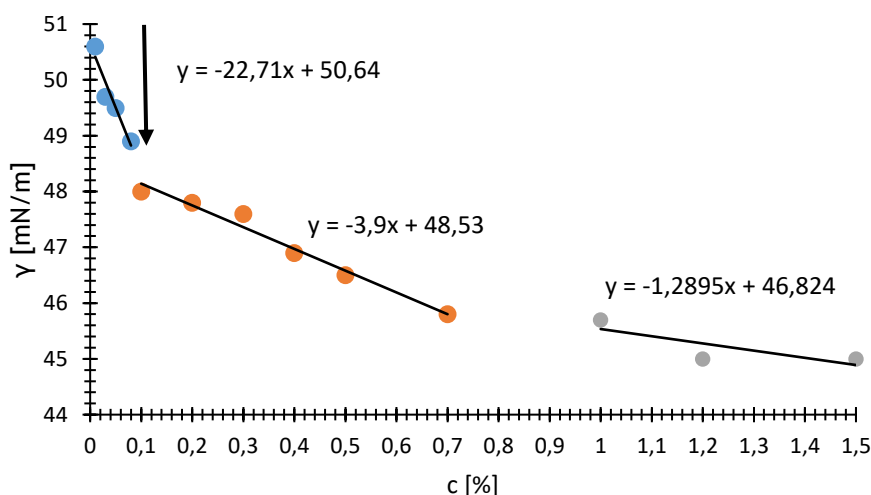
7.11 Antibakteriální účinek – disková difuzní metoda

Pro stanovení antibakteriální účinnosti byla využita agar difuzní metoda. Byl vybrán poloxamer P407 (o koncentraci 1 hm. %) s obsahem aktivních látek thymolu, tymiánového a eukalyptového oleje o koncentraci 1 hm. %. Tato směs byla inkorporována do základu tvořeného carbopolovým gelem, pro lepší manipulaci při provádění testu. Pro srovnání byly připraveny i vzorky samotných aktivních látek v carbopolu (o koncentraci 1 hm. %) bez poloxameru. Test probíhal na Petriho miskách s Mueller-Hinton agarem, na které byl naočkován 1 ml bakteriální suspenze o koncentraci 0,5 McF (testované mikroorganismy – *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*). Po zaschnutí byly na povrch půdy sterilní pinzetou položeny dva sterilní disky o průměru 6 mm, na něž bylo postupně nanášeno (pomocí mikropipety s oříznutou špičkou) 50 µl gelového vzorku. Misky byly poté kultivovány při teplotě 35 °C 24 hodin. Po této době byly vyhodnoceny případné inhibiční zóny jako průměry okolo vzorků, kde nebyl zaznamenán bakteriální růst.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Stanovení kritické micelární koncentrace tenzidů a jejich směsí

Kritická micelární koncentrace poloxamerů a jejich směsí byla stanovena pomocí měření povrchového napětí metodou Wilhelmyho destičky. Hodnoty povrchového napětí byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci daného tenzidu nebo směsi tenzidů. Z grafů byla pak v oblasti charakteristického zlomu pomocí průsečíků směrnic vyhodnocena kritická micelární koncentrace, která se v případě polymerních tenzidů pohybuje řádově desetinách hm. %. Příklad závislosti povrchového napětí na koncentraci poloxameru P188 je uveden na Obr. 11.



Obr. 11 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu P188 při 25 °C

Z grafu je patrné, že křivka závislosti povrchového napětí na koncentraci polymerního tenzidu nemá úplně klasický charakter, ale lze pozorovat dva zlomy. Ohledně jejich interpretace se vědecké studie často rozcházejí. Například v práci Samitha a kol. [51] byla hodnota CMC tenzidu F68 stanovena z prvního inflexního bodu křivky z tenziometrického měření. Na druhou stranu, ve studii [52] byly pro surfaktant Lutrol F127 (odpovídá P407) získány křivky se dvěma zlomy, kdy druhý z nich je přičítán vzniku klasických micel, zatímco pro první zlom neexistuje zcela jednotné vysvětlení. Někteří autoři se domnívají, že může jít o důsledek tvorby agregátů do dimerů a větších celků. Jiné studie předpokládají, že první zlom může indikovat změnu uspořádání molekul polymerního surfaktantu na fázovém

rozhraní. Detailnější rozbor chování tenzidu F68 na fázovém rozhraní olej/voda je uveden v práci Svitove [53]. Kontinuální tenziometrií byla získána křivka obsahující tři regiony, přičemž každý odpovídá určitému uspořádání tenzidu na rozhraní, a to od expandované molekuly přes střední konformaci až po specifické uspořádání molekul do formy podobné „vlásence“.

Micelizační parametry všech testovaných kopolymerů měřené při 25 °C jsou shrnuty v Tabulce 6. Kritická micelární koncentrace zde byla vyhodnocena z prvního zlomu na křivce závislosti povrchového napětí na koncentraci, hodnoty v mM byly vypočítány s ohledem na střední molekulovou hmotnost kopolymerů. Z tabulky je patrné, že hodnoty CMC se pohybují v rozsahu od 0,01 do 0,16 mM. Z literární rešerše vyplývá, že kritická micelární koncentrace zásadně závisí na vybrané metodě měření, konkrétním typu tenzidu, přítomnosti nečistot, nebo jiných aditiv. Autoři Samith a kol. [51], kteří studovali účinky micelizace Pluronicu F68 (odpovídá našemu poloxameru P188) na cytotoxické vlastnosti, naměřili pomocí tenziometrie hodnoty CMC v rozmezí 0,07 až 0,35 mM, které zahrnuje námi získanou hodnotu (0,16 mM).

V Tabulce 6 jsou dále uvedeny hodnoty Gibbsovy micelizační energie ΔG_m , adsorpce na rozhraní Γ a plocha a , kterou na rozhraní zaujímá jedna molekula povrchově aktivní látky. Z výsledků vyplývá, že za daných podmínek docházelo ke spontánní tvorbě micel testovaných blokových kopolymerů, což dokazují záporné hodnoty ΔG_m . Největší adsorpce na rozhraní ($4,03 \cdot 10^{-7} \text{ mol/m}^2$) byla zaznamenána u tenzidu s nejnižší molekulovou hmotností P184.

Plocha, kterou zaujímá jedna PO skupina je $0,11 \text{ nm}^2$. Na základě tohoto faktu lze odhadovat celkovou plochu molekuly P184 a P188 (které obsahují 30 PO skupin) na $3,3 \text{ nm}^2$, P407 (65 PO skupin) na $7,12 \text{ nm}^2$. Námi změřené hodnoty se mírně liší (u prvních dvou poloxamerů jsou vyšší než teoretická hodnota) a naopak u P407 je změřená plocha a nižší. Důvodem u posledního zmíněného kopolymeru může být fakt, že molekula není adsorbována ve své expandované konfiguraci a na rozhraní se nachází pouze její frakce. Na druhou stranu, u poloxamerů P184 a P188 byl sledován jev opačný [54].

Tabulka 6. Micelární charakteristiky poloxamerních roztoků při 25 °C

Poloxamer	CMC [hm. %]	CMC [mM]	γ_{\min} [mN/m]	ΔG_m [kJ/mol]	$\Gamma \cdot 10^{-7}$ [mol/m ²]	a [nm ²]
P184	0,15	0,05	37,4	-4702,62	4,03	4,12
P188	0,13	0,16	45,0	-5057,34	3,15	5,26
P407	0,13	0,01	38,7	-5057,34	3,93	4,23

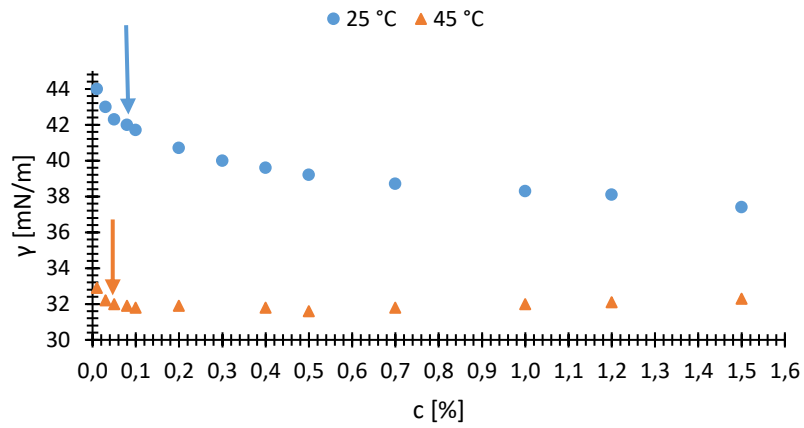
Tabulka 7. Micelární charakteristiky poloxamerních roztoků při 45 °C

Poloxamer	CMC [hm. %]	CMC [mM]	γ_{\min} [mN/m]	ΔG_m [kJ/mol]	$\Gamma \cdot 10^{-7}$ [mol/m ²]	a [nm ²]
P184	0,06	0,02	31,6	-7441,75	2,16	7,68
P188	0,11	0,01	38,4	-5838,46	4,20	3,95
P407	0,11	0,01	38,6	-5838,46	4,23	3,92

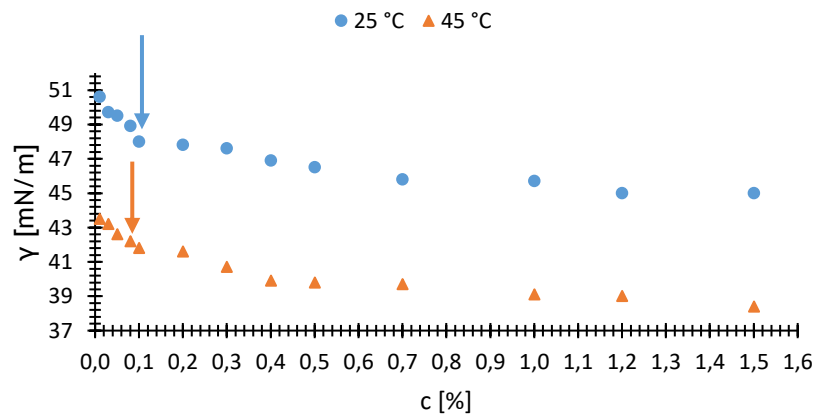
Micelizační proces blokových kopolymerů je silně závislý na teplotě, proto bylo provedeno také měření při zvýšené teplotě (45 °C). Obecným předpokladem je, že se zvyšující se teplotou klesá hodnota CMC díky zvyšující se hydrofobicitě propylen-oxidových skupin. Toto tvrzení bylo prokázáno také naším měřením, jak je patrné nejen z hodnot CMC a minimálního dosaženého povrchového napětí γ_{\min} , ale také z Gibbsovy energie micelizace ΔG_m , u níž platí, že čím více má zápornou hodnotu, tím snáze proces tvorby micel probíhá (Tabulka 7). Nejvýraznější pokles kritické micelární koncentrace v mM (o celý jeden řád) byl pozorován u vzorku P188. S rostoucí teplotou došlo také k poklesu minimálního dosaženého povrchového napětí γ_{\min} (což je zřetelné i ze srovnání závislostí povrchového napětí na koncentraci (Obr. 13)) a plochy, kterou zaujímá jedna molekula na rozhraní agregátu, s výjimkou P184, kdy byl naopak sledován nárůst tohoto parametru.

Pokles hodnoty CMC u poloxamerních surfaktantů byl zaznamenán také v práci autorů Gyulai a kol. [55], kteří využili metodu fluorimetrie. V případě F127 (odpovídá našemu P407) získali hodnotu kritické micelární koncentrace 3,3 g/l při 25 °C a 0,09 g/l při 37 °C, což odpovídá koncentraci 0,3 a 0,009 hm. %. Podobně byla snížena kritická micelární

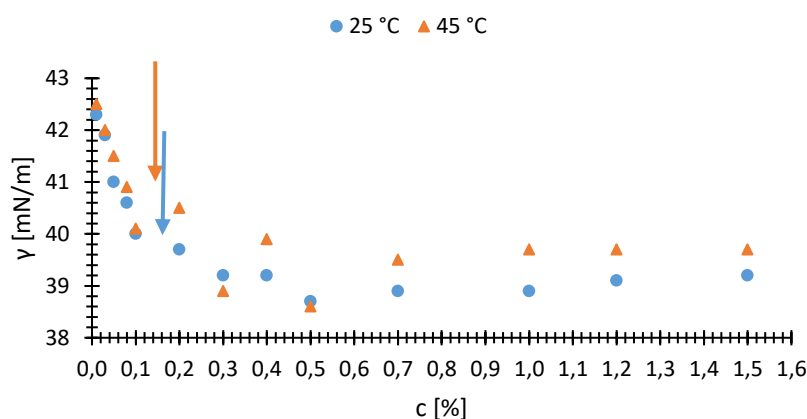
koncentrace u směsi na bázi poloxameru 407 a Pluronicu 123. Zvýšením teploty z 25 na 45 °C došlo k poklesu CMC o zhruba 38 % [49].



Obr. 12 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu P184 při 25 °C a 45 °C



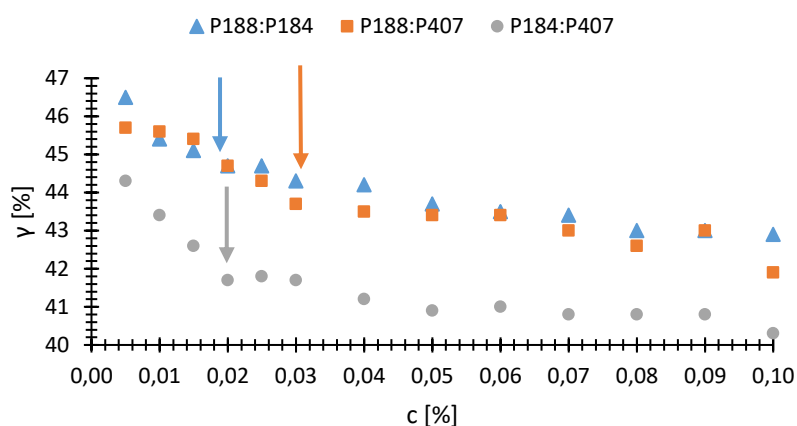
Obr. 13 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu P188 při 25 °C a 45 °C



Obr. 14 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu P407 při 25 °C a 45 °C

Vzhledem k tomu, že řada tenzidových směsí vykazuje synergické účinky, bylo v další části přistoupeno k měření povrchového napětí kombinací poloxamerů v poměru 1:1. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 15 a v Tabulce 8. Hodnoty CMC směsí získané z experimentálních dat (CMC^{*}) potvrzují synergický účinek, jelikož v případě všech kombinací došlo k poklesu koncentrace tvorby prvních micel. Tento jev je nejvíce patrný na směsích s obsahem P188, který měl sám o sobě CMC hodnotu o řád vyšší (viz Tabulka 6). Pro srovnání jsou v Tabulce 8 uvedeny i hodnoty CMC^c, které byly počítány z Clintonova vztahu (Rovnice 1). Data ukazují, že v případě kombinací P184:P407 a P188:P407 byly tyto teoretické hodnoty nižší, zatímco u P184:P188 byl zaznamenán nárůst oproti výsledku získanému z experimentálního měření, pomocí průsečíků směrnice.

Přestože hodnoty γ_{\min} se pohybovaly okolo 40 mN/m, tedy o něco výš, než v případě jednotlivých poloxamerů z hodnot Gibbsovy micelární energie je zřejmé, že směsné roztoky měly pozitivní vliv na tvorbu micel. Zároveň došlo ke zvýšení adsorpce na rozhraní a poklesu plochy a , a to až na 1,73 nm² v případě kombinace P188:P407. Tento fakt je důsledkem těsnějšího uspořádání molekul na rozhraní a tím i efektivnější adsorpce. Pro charakterizaci směsných micel slouží parametr β , kdy negativní odchylka od ideálního mísení indikuje působení přitažlivých sil mezi molekulami surfaktantu v micelle. Synergický účinek směsi tenzidů byl naším měřením potvrzen, hodnoty β byly v rozsahu od -1,6 do -3,8. Hodnoty x_M vypovídající o složení směsné micely se zásadně nelišily od původního složení směsi.



Obr. 15 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci směsi tenzidů při 25 °C

Tabulka 8. Micelární charakteristiky směsí poloxamerních roztoků v poměru 1:1

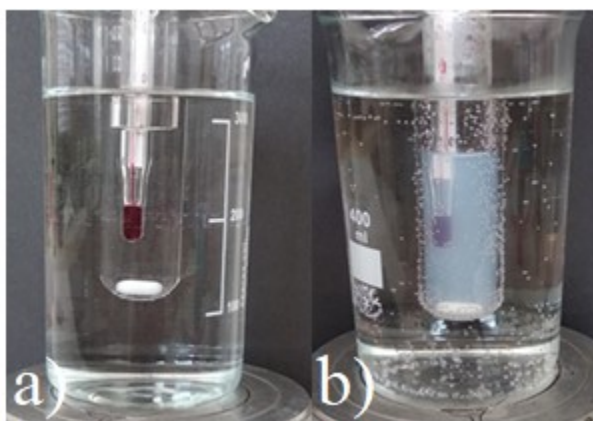
	P188:P184	P188:P407	P184:P407
CMC [hm. %]	0,02	0,03	0,02
CMC* [mM]	0,04	0,03	0,04
CMC^c [mM]	0,08	0,02	0,02
γ_{min} [mN/m]	42,9	41,9	40,3
ΔG_m [kJ/mol]	-10100,1	-8776,2	-9697,2
Γ · 10⁻⁷ [mol/m²]	5,28	9,58	7,31
a [nm²]	3,15	1,73	2,27
χ_M	0,40	0,34	0,39
β	-3,84	-1,56	-3,16

Pozn.: CMC* – hodnoceno z experimentálních dat, CMC^c – počítáno z Clintonova vztahu.

Synergické účinky směsi tenzidů byly prokázány i v práci autorů Thurna a kol. [56], kteří připravili a charakterizovali směsné micely na bázi poloxameru F127 (P407) a SDS. Li a kol. [7] využili směsi Pluronicu P105 a konjugátu poly(ethylene glycol)-phosphatidyl ethanolaminu pro enkapsulaci léku kamphotecinu pro zvýšení stability a cytotoxicity.

8.2 Stanovení bodu zákalu

Výsledky měření bodu zákalu stanovovaného u 1 hm. % poloxamerních roztoků jsou uvedeny v Tabulce 9. Je patrné, že dosažené výsledky velmi dobře korelují s hodnotami uvedenými v literatuře [46]. Nejnižší bod zákalu (55 °C) byl naměřen u poloxameru s nejnižší molekulovou hmotností, tedy P184. Další dva poloxamery vykazovaly bod zákalu vyšší než 100 °C, přičemž vysoká hodnota bodu zákalu u poloxamerů P188 a P407 je přičítána vysokému hydrofilnímu podílem PEO skupin v molekule.



Obr. 16 Měření bodu zákalu 1 hm. % P184
vzhled roztoku a) pod bodem zákalu,
b) nad bodem zákalu

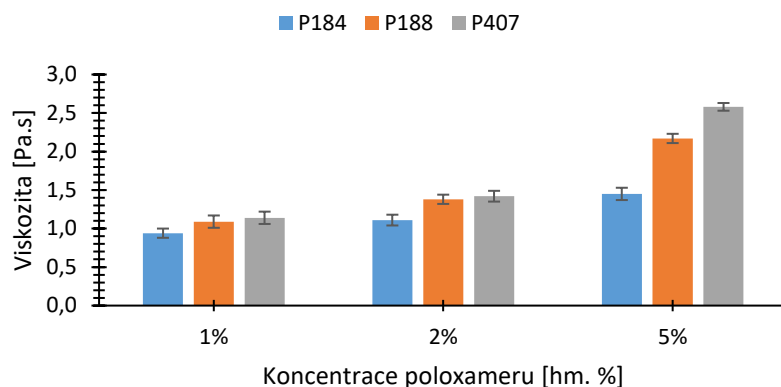
Tabulka 9. Bod zákalu poloxamerních roztoků

Poloxamer	Bod zákalu [°C] [46]	Bod zákalu [°C]
P184	57 – 61	55
P188	>100	>100
P407	>100	>100

8.3 Stanovení viskozity

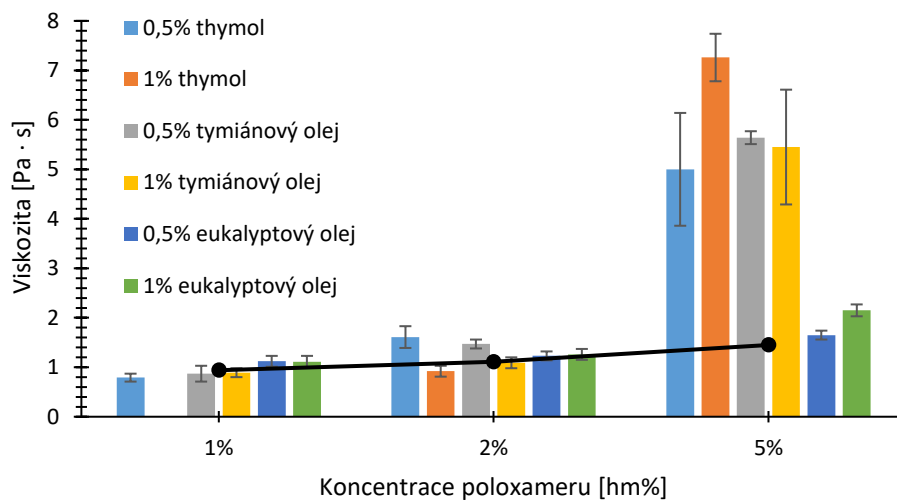
Viskozita u roztoků poloxamerů bez a v přítomnosti aktivních látek byla měřena při 25 °C. Z Obr. 17 je patrné, že s koncentrací polymerních tenzidů (od 1 do 5 hm. %) docházelo k nárůstu hodnot viskozity, a to od 0,94 do 1,45 Pa·s pro P184, od 1,09 do 2,17 Pa·s pro P188 a od 1,14 do 2,58 Pa·s pro P407. Největší zvýšení, a to o 56 % bylo sledováno právě

v případě posledního zmíněného poloxameru P407, který má z testovaných surfaktantů nejvyšší molekulovou hmotnost (12 600 g/mol).

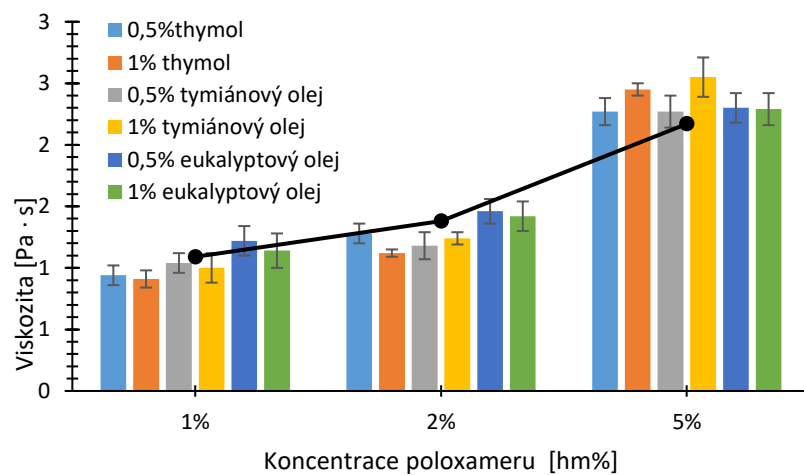


Obr. 17 Graf závislosti viskozity na koncentraci poloxamerů

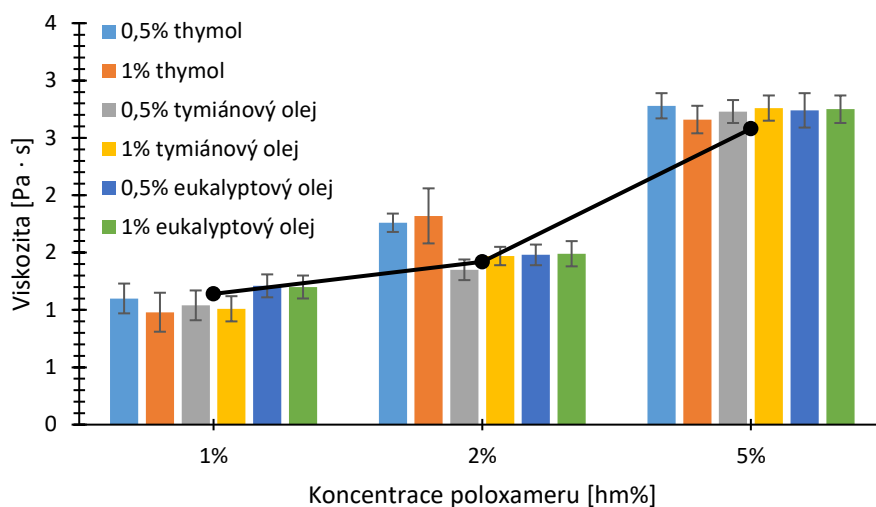
Podobně, v případě systémů s aktivními látkami, docházelo ke zvyšování viskozity s rostoucí koncentrací poloxamerů (Obr. 18, Obr. 19, Obr. 20). V případě 1 a 2 hm. %ních roztoků se hodnoty pohybovaly v rozmezí od cca 0,7 do 1,8 Pa·s, tedy podobně jako u samotných poloxamerních roztoků. K vyššímu nárůstu hodnot (až na více než 7 mPa·s v případě P184 s 1 hm. % thymolu) došlo v případě 5 hm. %ních roztoků. Například mezi 2 a 5 hm. %ním roztokem P184 s 1 hm. % thymolu činil rozdíl ve viskozitě více než 87 %. Z výsledků je tedy zřejmé, že zásadní vliv měla koncentrace kopolymeru. Na druhou stranu, při srovnání hodnot získaných měření různých přísad aktivní látky nebyl zjištěn zásadní rozdíl, pouze s výjimkou systému P184 (5 hm. %), kdy rozdíl hodnot činil okolo 31 % při srovnání 0,5 a 1 hm. % přísadky thymolu. Po srovnání jsou v grafech uvedeny černé křivky značící viskozity samotných poloxamerních roztoků.



Obr. 18 Graf závislosti viskozity na koncentraci tenzidu P184 s aktivními látkami



Obr. 19 Graf závislosti viskozity na koncentraci tenzidu P188 s aktivními látkami

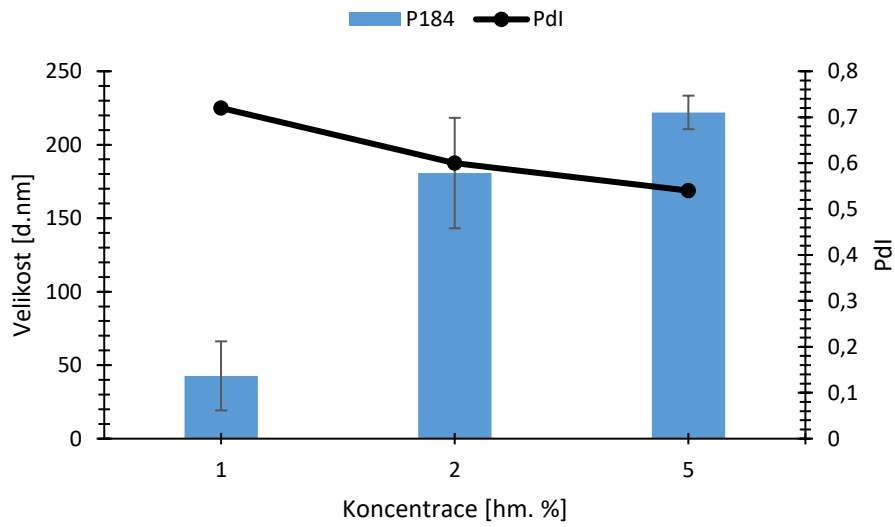


Obr. 20 Graf závislosti viskozity na koncentraci tenzidu P407 s aktivními látkami

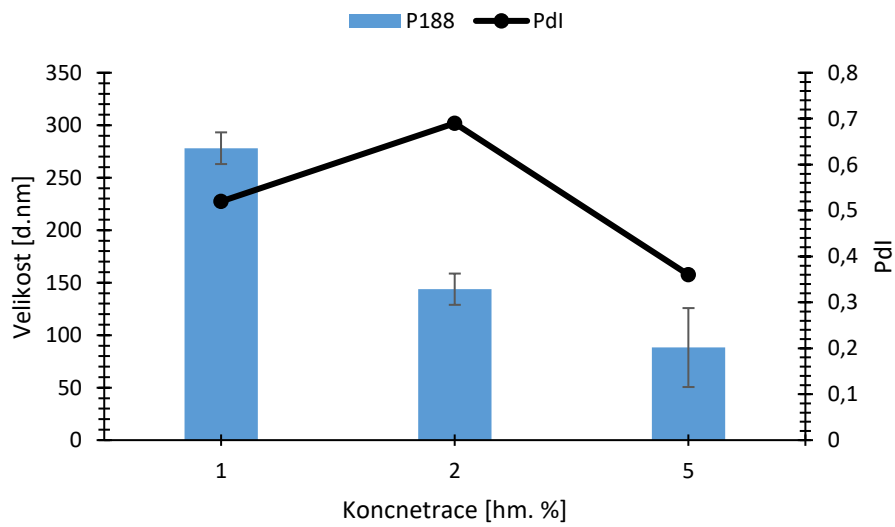
8.4 Stanovení velikosti částic

Velikost částic a distribuce má zásadní vliv na vlastnosti a stabilitu koloidních systémů [60]. Z tohoto důvodu bylo měření prováděno ihned po přípravě roztoků a následně pak po týdnu, resp. dvou měsících skladování (kapitola 8.6). Výsledky měření velikosti částic vzorků samotných poloxamerních roztoků jsou uvedeny na následujících Obr. 21 až Obr. 23. Z grafů lze vidět, že u poloxameru s nejnižší molekulovou hmotností P184 docházelo s jeho rostoucí koncentrací ke zvyšování velikosti částic (v rozsahu od 43 do 222 nm). Odlišný trend byl sledován u dalších dvou poloxamerů (P188, P407), kdy se zvyšující se koncentrací byly naměřeny menší částice. Podobný jev byl sledován ve studii autorů AL-Obaidy a kol. [58], kdy s rostoucí koncentrací poloxameru P407 došlo ke snížení velikosti šelakových nanočástic ze 120 nm na cca 80 nm.

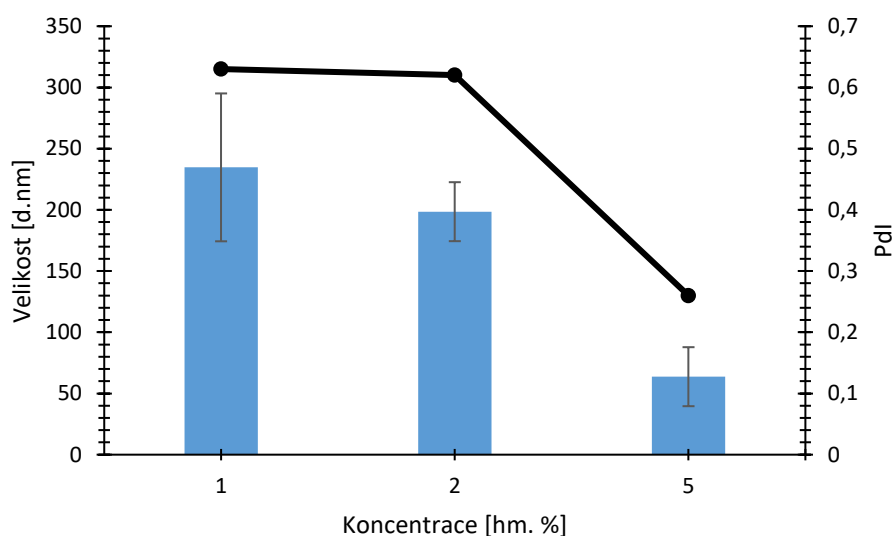
Černé křivky v grafech znázorňují hodnoty PdI, které měly ve většině případů sestupný trend s rostoucí koncentrací poloxamerů. Jejich hodnoty se u 1 %ních roztoků pohyboval od 0,52 až 0,72, zatímco u 5 %ních poloxamerů byly hodnoty PdI v rozsahu 0,26 až 0,54.



Obr. 21 Graf závislosti velikosti částic a polydisperzity na koncentraci tenzidu P184



Obr. 22 Graf závislosti velikosti částic a polydisperzity na koncentraci tenzidu P188



Obr. 23 Graf závislosti velikosti částic a polydisperzity na koncentraci tenzidu P407

Obecně platí, že poloxamerní micely jsou schopny ve vodných roztocích tvořit sférické částice s hydrofobním jádrem tvořeným PPO bloky a hydrofilním obalem na bázi hydratovaných PEO řetězců. V závislosti na koncentraci a teplotě vykazují ovšem tyto kopolymery značný polymorfismus, může tedy docházet k tvorbě dalších větších agregátů, od sférických, přes tyčinkovité, až po prodloužené elipsoidy. Lze tedy s určitostí konstatovat, že výsledná konfigurace a agregační číslo závisí na více faktorech [57]. Přesto, jednu z klíčových rolí, ovlivňujících velikost poloxamerních agregátů, hraje molekulární struktura a délka, případně počet hydrofilních a hydrofobních bloků. Částice poloxameru P407, který obsahuje ve své molekule více etylenoxidových a propylenoxidových jednotek ($\text{EO}_{100}\text{PO}_{65}\text{EO}_{100}$) může zaujímat větší velikost než micela P184 ($\text{EO}_{13}\text{PO}_{30}\text{EO}_{13}$). Tento fakt se projevil i u našich vzorků při nižších koncentracích 1 a 2 hm. % (Obr. 21, Obr. 23).

Výsledky měření velikostí částic u roztoků poloxamerů s aktivními látkami jsou uvedeny v Tabulkách 10 až 12. V případě systémů s thymolem, došlo opět se zvýšením koncentrace poloxameru P184 k nárůstu velikosti částic, naopak u P188 a P407 byl sledován pokles hodnot. Výjimkou tvořil roztok P188 s 1 hm. % thymolu, kde byl zaznamenán nárůst od 36 do 661 nm s koncentrací tenzidu od 1 do 5 hm. %. V případě vzorků s tymiánovým a eukalyptovým olejem docházelo většinou ke snižování velikosti částic s rostoucí koncentrací tenzidu, a to i v přítomnosti P184, s výjimkou vzorku s 1 hm. % tymiánového oleje. Je nutno zmínit, že roztoky s přísádky 1 hm. % aktivní látky byly obtížněji homogenizovatelné a

mohlo tak docházet snáze k sedimentaci, či agregaci částic, což se mohlo pak projevit na výkyvech a kolísání některých hodnot velikostí částic.

Je zajímavé, že v některých případech bylo pozorováno snížení velikosti poloxamerních částic se zabudovanou aktivní látkou v porovnání se samotnými poloxamery. Například při koncentraci 0,5 hm. % tymiánového oleje byl u P407 prokázán zásadní pokles velikostí oproti samotným poloxamerům (Obr. 23), a to až 82 % a 86 % pro 1 a 2 hm. %ní roztoky.

Odlišný jev byl sledován některými dalšími autory [49], [59], kde se velikost micel (na bázi P407, případně směsi s Pluronic 123) po enkapsulaci aktivní látky zásadně nezměnila, nebo se mírně zvýšila.

V případě našich vzorků byla nejmenší velikost částic (22,1 nm) naměřena u systému 5 hm. % P188 s 0,5 hm. % thymolu, naopak největší částice obsahoval roztok 5 hm. % P184 s 1 hm. % tymiánového oleje (692,9 nm).

Tabulka 10. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s thymolem

Typ a koncentrace poloxameru [hm. %]		Koncentrace thymolu [hm. %]			
		0,5		1	
		Velikost [d·nm]	PdI	Velikost [d·nm]	PdI
P184	1%	63,9 ± 0,6	0,40 ± 0,01		
	2%	120,6 ± 2,0	0,31 ± 0,05	72,5 ± 0,8	0,27 ± 0,04
	5%	370,6 ± 23,4	0,24 ± 0,13	478,6 ± 44,5	0,28 ± 0,15
P188	1%	185,4 ± 3,3	0,45 ± 0,11	35,9 ± 0,7	0,23 ± 0,01
	2%	48,4 ± 6,8	0,38 ± 0,28	77,1 ± 1,1	0,23 ± 0,05
	5%	22,1 ± 0,3	0,24 ± 0,02	661,2 ± 13,9	0,26 ± 0,06
P407	1%	315,7 ± 11,9	0,27 ± 0,01	347,3 ± 23,8	0,38 ± 0,15
	2%	55,0 ± 0,9	0,41 ± 0,01	323,0 ± 9,9	0,41 ± 0,10
	5%	22,5 ± 0,3	0,13 ± 0,02	26,9 ± 0,2	0,25 ± 0,01

Tabulka 11. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s tymiánovým olejem

Typ a koncentrace poloxameru [hm. %]		Koncentrace tymiánového oleje [hm. %]			
		0,5		1	
		Velikost [d·nm]	PdI	Velikost [d·nm]	PdI
P184	1%	370,3 ± 11,7	0,41 ± 0,21	73,3 ± 0,8	0,41 ± 0,04
	2%	265,7 ± 6,0	0,36 ± 0,05	155,5 ± 4,2	0,47 ± 0,04
	5%	212,7 ± 3,1	0,42 ± 0,02	692,9 ± 64,3	0,21 ± 0,14
P188	1%	141,7 ± 20,2	0,67 ± 0,21	133,4 ± 1,3	0,41 ± 0,17
	2%	35,5 ± 5,6	0,36 ± 0,09	322,1 ± 43,1	0,49 ± 0,06
	5%	92,4 ± 53,6	0,44 ± 0,14	39,1 ± 1,5	0,27 ± 0,04
P407	1%	42,6 ± 6,2	0,32 ± 0,11	59,8 ± 1,2	0,33 ± 0,02
	2%	28,1 ± 0,4	0,27 ± 0,01	33,1 ± 0,4	0,35 ± 0,01
	5%	23,7 ± 0,3	0,16 ± 0,02	26,6 ± 0,67	0,25 ± 0,01

Tabulka 12. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s eukalyptovým olejem

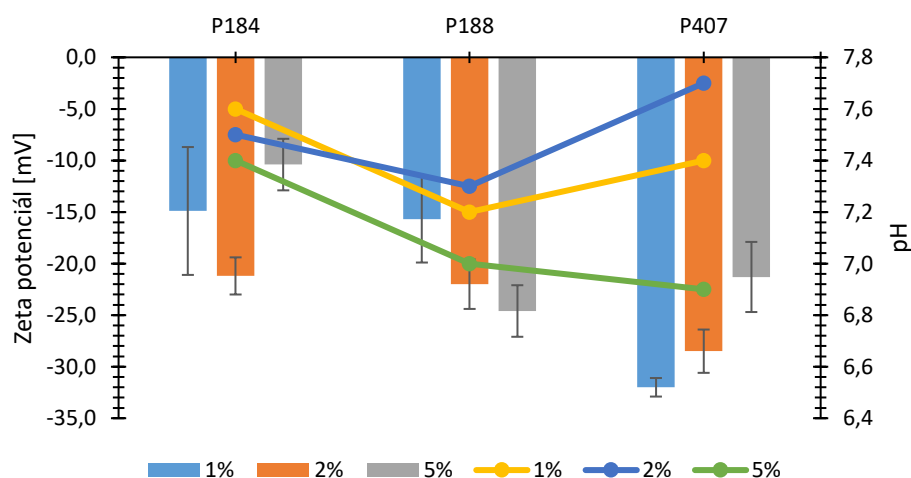
Typ a koncentrace poloxameru [hm. %]		Koncentrace eukalyptového oleje [hm. %]			
		0,5		1	
		Velikost [d·nm]	PdI	Velikost [d·nm]	PdI
P184	1%	533,8 ± 85,9	0,73 ± 0,06	675,8 ± 44,4	0,56 ± 0,06
	2%	402,1 ± 12,8	0,62 ± 0,09	309,7 ± 5,5	0,39 ± 0,01
	5%	163,4 ± 3,8	0,11 ± 0,02	311,2 ± 9,3	0,31 ± 0,05
P188	1%	265,5 ± 2,9	0,41 ± 0,17	217,7 ± 9,0	0,97 ± 0,05
	2%	208,5 ± 16,1	0,35 ± 0,04	218,1 ± 2,4	0,67 ± 0,21
	5%	128,9 ± 62,9	0,89 ± 0,20	432,4 ± 39,5	0,73 ± 0,25
P407	1%	41,3 ± 4,0	0,42 ± 0,09	37,0 ± 1,4	0,39 ± 0,06
	2%	27,1 ± 0,3	0,21 ± 0,04	31,6 ± 0,3	0,29 ± 0,02
	5%	28,4 ± 0,1	0,28 ± 0,05	30,8 ± 0,2	0,31 ± 0,01

8.5 Stanovení zeta potenciálu

Je obecně známo, že zeta potenciál vyjadřuje elektrostatický náboj částice v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech kapaliny, který následně ovlivňuje procesy agregace, adsorpce a dispergace. Pokud částice nesou dostatečně velký kladný nebo záporný náboj, jsou považovány za elektrostaticky stabilní v důsledku elektrického odpuzování [60].

Z grafu (Obr. 24) je patrné, že zeta potenciál všech poloxamerních roztoků se pohyboval v poměrně velkých záporných hodnotách, a to přesto že poloxamery se řadí mezi neionické blokové kopolymery. Tento jev nelze zcela spolehlivě vysvětlit. Spojnicové grafy v Obr. 24 značí pH roztoků. Průměrné pH 1%ních roztoků činilo 7,4, u 2% roztoků 7,5 a u 5%ních roztoků 7,1.

Vliv povrchově aktivních látek na stabilitu, a tedy i zeta potenciál, různých nosičů je předmětem řady studií. V práci [60] autoři studovali vliv různých surfaktantů na vlastnosti nanostrukturovaných lipidových nosičů. Přídavek neionických povrchově aktivních látek (poloxamer 188 a Tween 80) zde vedl ke snížení rozdílu náboje od nulové hodnoty. Předpokládá se, že poloxamer tvořil charakteristické větší micelární agregáty, kdy méně polární poly(propylenoxidové) segmenty se soustředily do hydrofobního micelárního jádra obklopeného vysoce hydratovanými flexibilními poly(oxyetylenoxidovými) řetězci. Zvýšení zeta potenciálu, bylo dosaženo s přidavkem ionického surfaktantu do systému. Nicméně, poloxamer P188 zajistil zvýšení sterické stability.

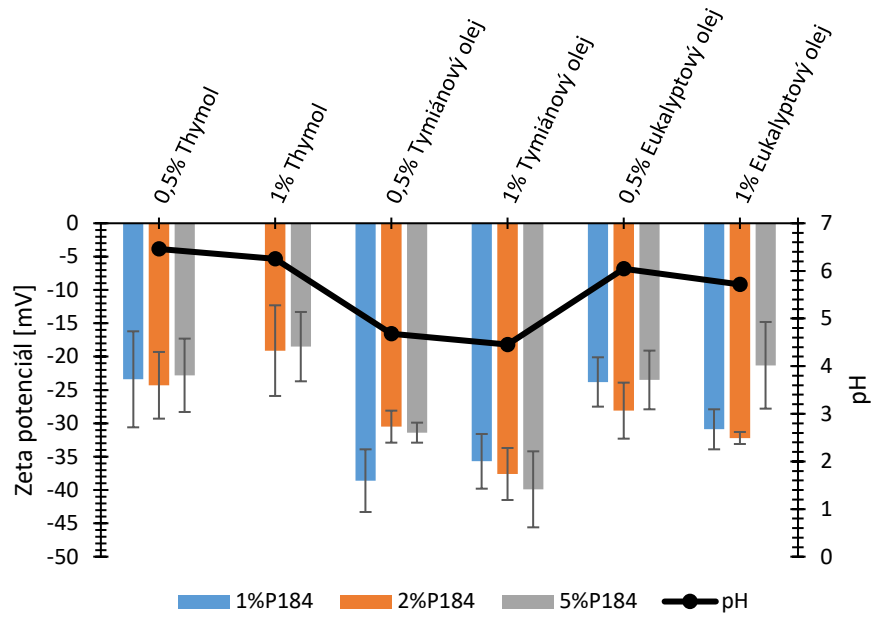


Obr. 24 Graf závislosti zeta potenciálu a pH na koncentraci tenzidů

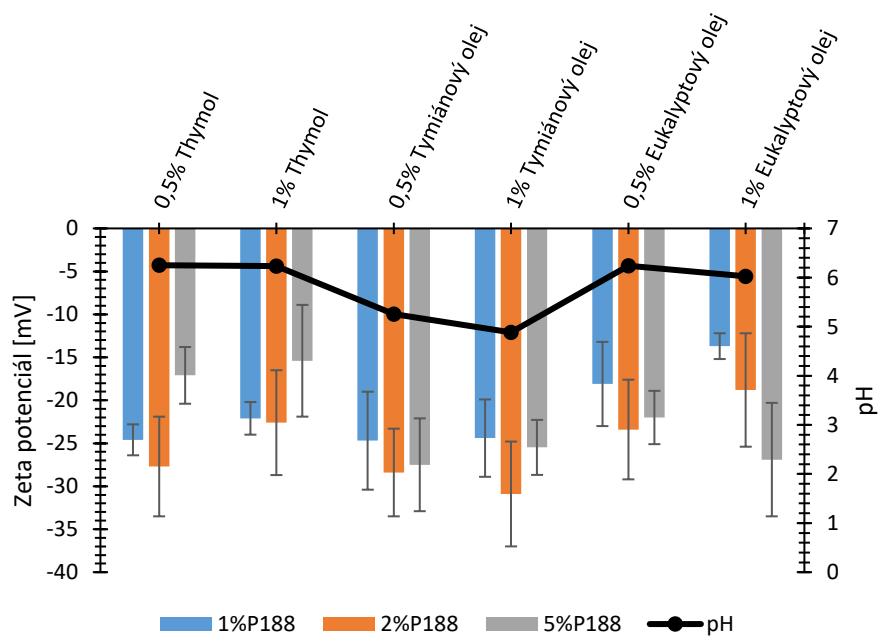
Podobný jev byl prokázán v práci [58], kde autoři studovali nosiče na bázi šelaku s využitím poloxameru P407 jako stabilizátoru. Při měření zeta potenciálu bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací tohoto neionického surfaktantu docházelo opět ke snižování rozdílu hodnot od nuly (při přidávku 0,4 hm. % se náboj pohyboval okolo -15 mV), v důsledku adsorpce P407 vrstvy na povrchu částice a zvýšení sterické stabilizace. I při našem měření vyvolalo zvyšování koncentrace P407 z 1 na 5 hm. % snižování rozdílu zeta potenciálu, konkrétně z -32 na 21 mV (Obr. 24). Ovšem, v případě dalších dvou kopolymerů (P184 a P188) nebyl sledován stejný trend. Kolísání hodnot zeta potenciálu s rostoucí koncentrací P407 bylo pozorováno v práci autorů Elgegrena okol. [61]. Kopolymer P407 zde byl využit pro potenciální stabilizaci nanočástic na bázi alginátu a chitosanu. Při nižších koncentracích poloxameru (0,1 na 0,3 hm. %) došlo nejdříve ke snížení zeta potenciálu, ovšem při vyšších přídavech (0,5 na 1 hm. %) se hodnota zeta potenciálu opět zvýšila.

Obecné pravidlo, že neionické surfaktanty nemají zásadní vliv na zeta potenciál nebylo potvrzeno ani při měření vzorků poloxamerů s aktivními látkami (Obr. 25, Obr. 26, Obr. 27), I u těchto systémů se náboj pohyboval ve značně záporných hodnotách, a to až téměř -40 mV u vzorků P184 s tymiánovým olejem. Zde je ovšem nutno vzít v potaz právě vliv inkorporované aktivní látky. V rámci diplomové práce zeta potenciál samotných aktivních látek nebyl měřen, ale z literární rešerše byly získány hodnoty -15 mV pro thymol [62] a -25,6 mV pro tymiánový olej [63].

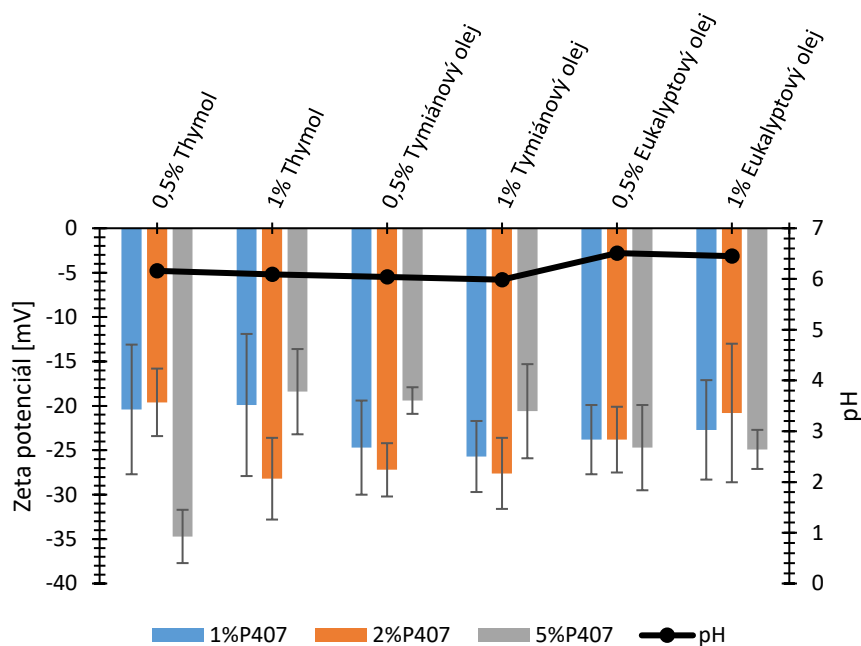
V grafech jsou také znázorněny výsledky průměrů měření pH roztoků (černé křivky). Hodnoty se pohybovaly v rozsahu od 4,1 v případě 5 hm. % P184 s 0,5 hm. % tymiánového oleje do 6,7 u roztoku 5 hm. % P407 s eukalyptovým olejem. V porovnání s pH samotných poloxamerních roztoků došlo tedy s přidávkem aktivních látek k mírnému poklesu hodnot.



Obr. 25 Graf závislosti zeta potenciálu a pH na koncentraci tenzidu P184



Obr. 26 Graf závislosti zeta potenciálu a pH na koncentraci tenzidu P188

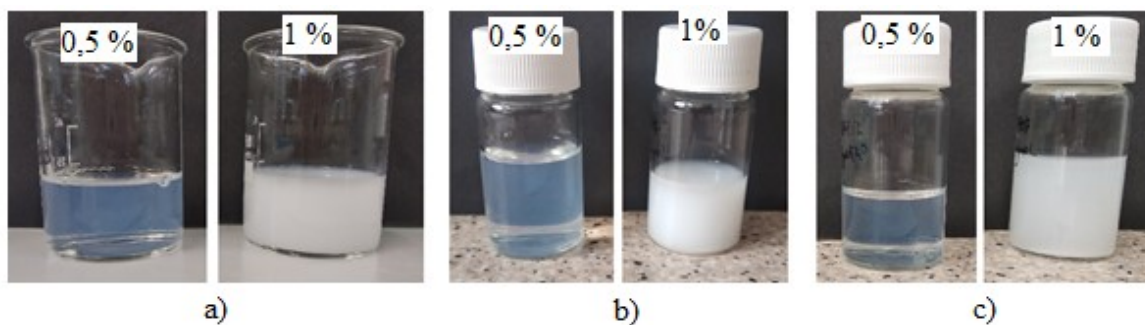


Obr. 27 Graf závislosti zeta potenciálu a pH na koncentraci tenzidu P407

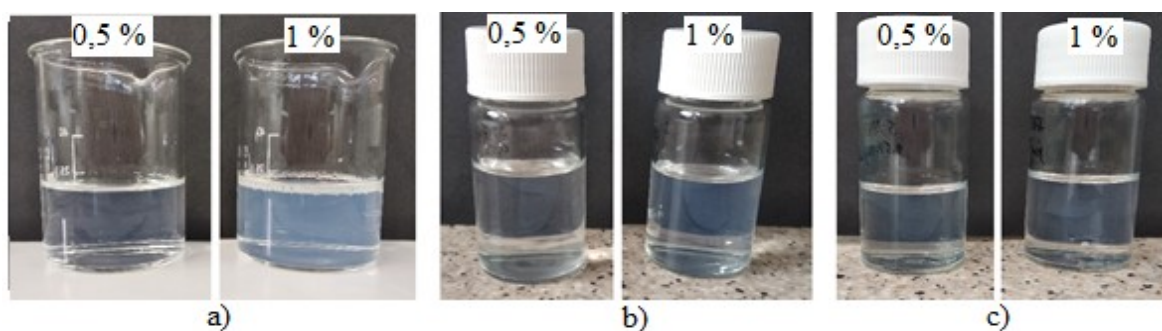
8.6 Stabilitní studie

Stabilita připravených systémů byla hodnocena vizuálně a dále pak měřením velikosti částic a zeta potenciálu, v určitých časových intervalech od přípravy vzorků (po týdně, resp. 60 dnech, kdy vzorky byly skladovány při 25 °C, resp. 4 °C).

Na následujících obrázcích (Obr. 28 až Obr. 35) je srovnání fotek roztoků vybraných poloxamerů P407 s aktivními látkami pořízených v den přípravy, po týdnu skladování při 25 °C a po 2 měsících při 4 °C. Jak již bylo zmíněno, horší homogenita byla sledována u vzorků obsahujících 1 hm. % aktivní látky. Zatímco vzorky s 2 hm. % P407 a 0,5 hm. % jsou homogenní a slabě průsvitné během celého stabilitního testu, přidavek aktivní látky 1 hm. % způsobil zásadní změnu vzhledu roztoku (Obr. 28). Rozdíl v těchto vzorcích byl zásadně eliminován s přidavkem poloxameru (na 5 hm. %), jak je zřejmé z Obr. 29.

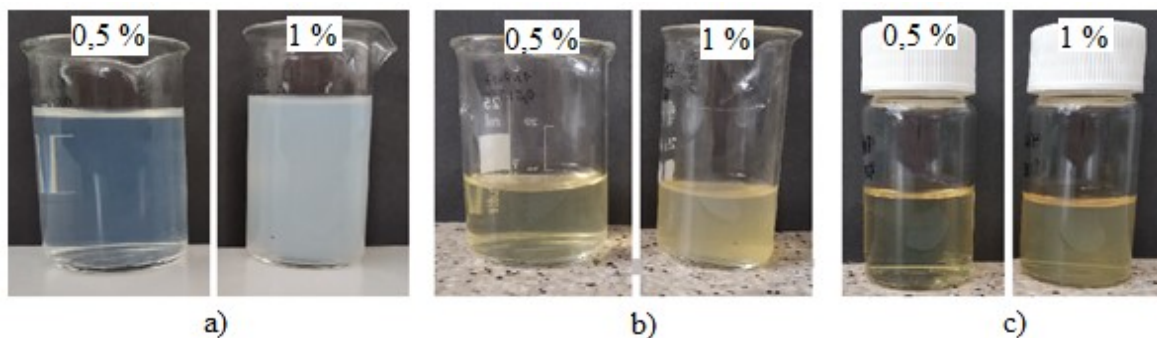


Obr. 28 Vzorky 2 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % thymolem
a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C

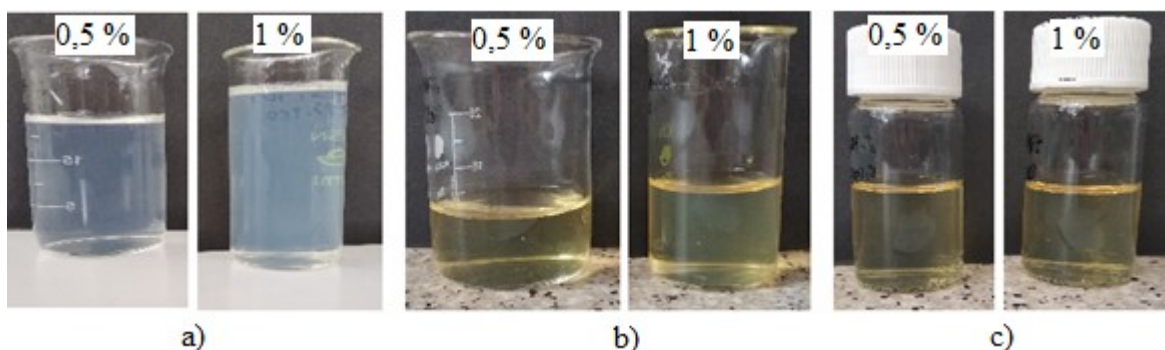


Obr. 29 Vzorky 5 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % thymolem
a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C

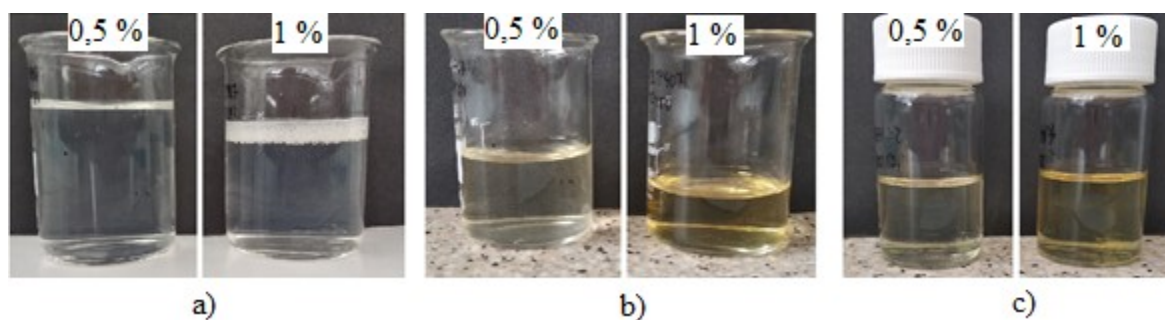
U vzorků s tymiánovým olejem, byla již po týdnu skladování pozorována změna barvy roztoků ze světle mléčné na nažloutlou. Je známo, že některé oleje jsou citlivější vůči oxidačním mechanismům. Důležitou roli hrají podmínky skladování a případné odpařování vodné fáze, které mohou způsobit zintenzivnění barvy původně bezbarvých sloučenin, a to i bez jakékoliv degradační reakce. Tento jev, tedy kompletní změna barvy viditelná pouhým okem, byl sledován například u olejů z levandule, rozmarýnu a právě tymiánu [64]. Na druhou stranu, charakter roztoků se již dále neměnil ani při delším skladování v lednici (Obr. 30). Opět lze sledovat vliv rostoucí koncentrace poloxameru P407 na vzhled vzorků (zejména v den přípravy), které se změnilo z transparentních na průhledné (Obr. 32).



Obr. 30 Vzorky 1 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % tymiánovým olejem
a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C

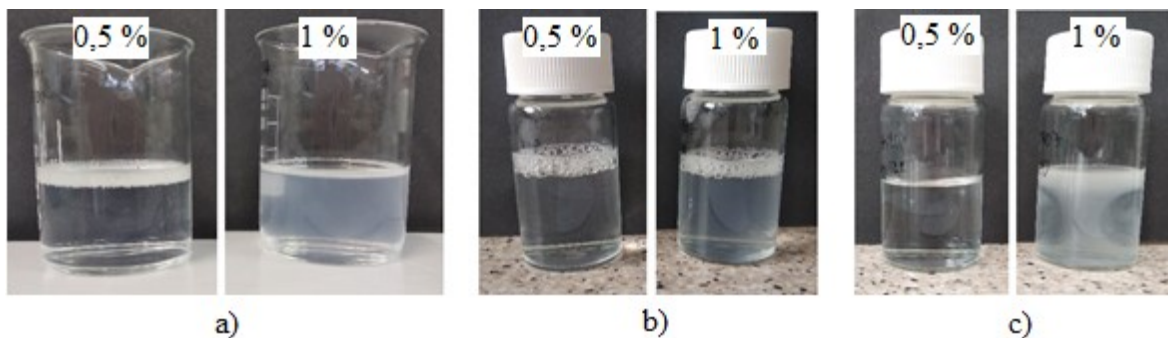


Obr. 31 Vzorky 2 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % tymiánovým olejem
a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C

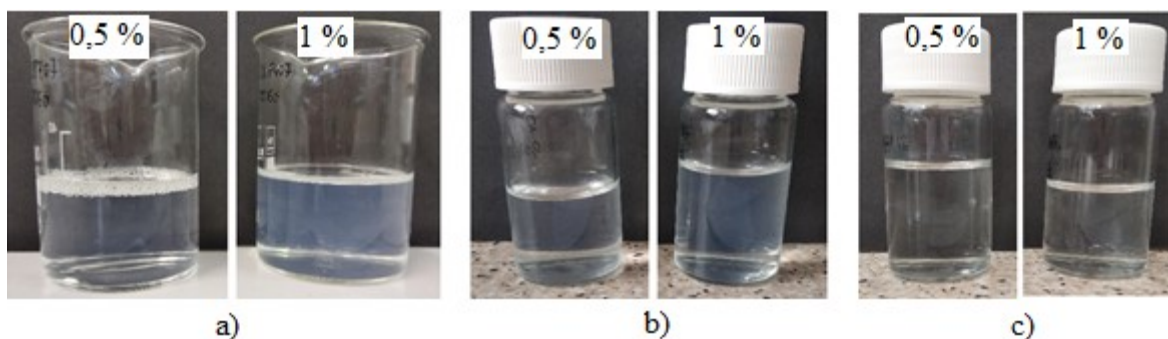


Obr. 32 Vzorky 5 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % tymiánovým olejem
a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C

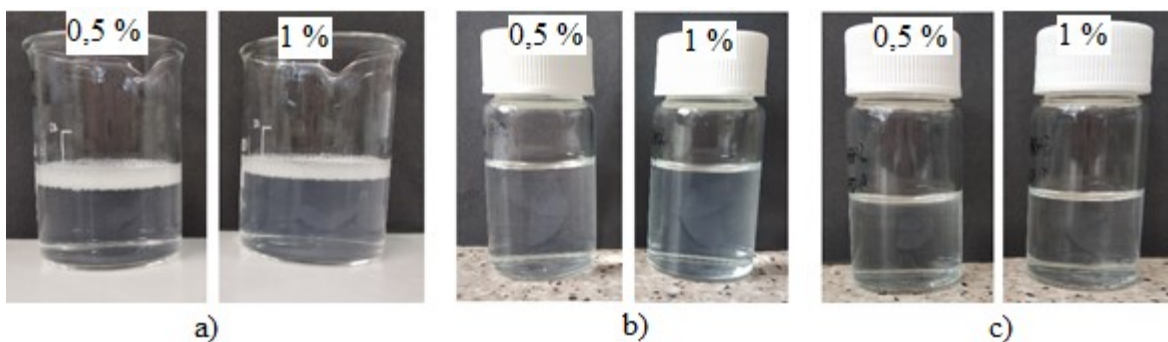
Na základě vizuálního hodnocení lze konstatovat, že jako nejstabilnější se jevíly roztoky s obsahem eukalyptového oleje, které během stabilitního experimentu v podstatě neměnily svůj charakter (Obr. 33 až Obr. 35). Výjimku tvořil vzorek 1 hm. % P407 s 1 hm. %ním eukalyptovým olejem, u nějž byl po dvou měsících skladování při 4 °C sledován mléčný zákal (Obr. 33c).



Obr. 33 Vzorky 1 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % eukalyptovým olejem
a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C



Obr. 34 Vzorky 2 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % eukalyptovým olejem
a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C



Obr. 35 Vzorky 5 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % eukalyptovým olejem
a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C

Měřením velikosti částic po týdnu skladování při laboratorní teplotě bylo prokázáno, že pozitivní vliv na stabilitu měla rostoucí koncentrace poloxamerů, kdy v případě 2 a 5 hm. % roztoků nedocházelo k zásadním změnám velikosti micel. Výsledky vybraných vzorků jsou, spolu s indexy PdI shrnuty v Tabulkách 13 až 15.

Tabulka 13. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s thymolem po týdnu při 25 °C

Typ a koncentrace poloxameru [hm. %]		Koncentrace thymolu [hm. %]			
		0,5		1	
		Velikost [d·nm]	PdI	Velikost [d·nm]	PdI
P184	1%	169,4 ± 3,8	0,43 ± 0,03	376,3 ± 9,9	0,19 ± 0,02
	2%	777,0 ± 18,8	0,22 ± 0,11	32,2 ± 0,1	0,27 ± 0,01
	5%	312,3 ± 7,1	0,33 ± 0,05	376,9 ± 13,4	0,37 ± 0,07
P407	1%	130,3 ± 0,8	0,56 ± 0,01	-	-
	2%	50,7 ± 0,5	0,27 ± 0,01	398,6 ± 6,4	0,57 ± 0,02
	5%	24,1 ± 0,1	0,06 ± 0,03	34,6 ± 0,2	0,32 ± 0,01

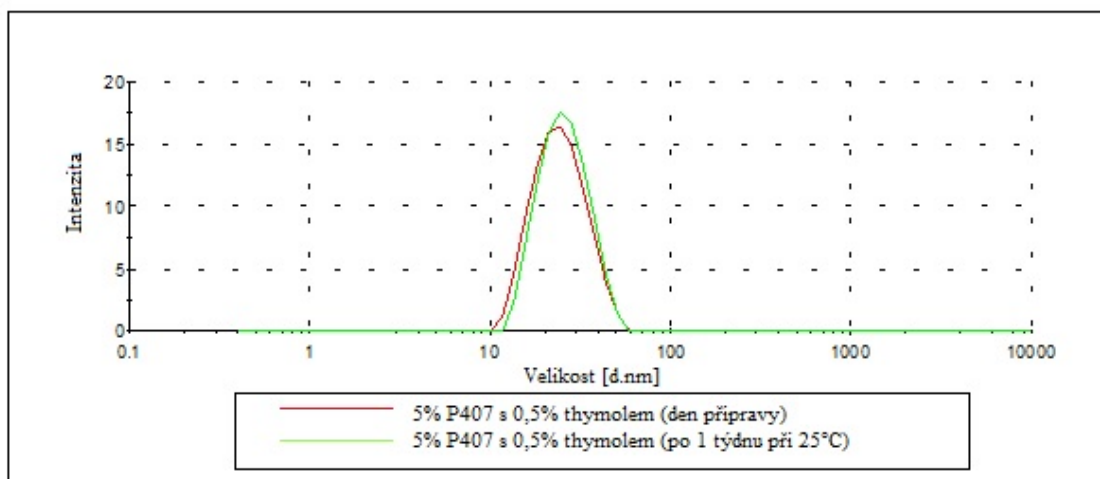
Tabulka 14. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s tymiánovým olejem po týdnu při 25 °C

Typ a koncentrace poloxameru [hm. %]		Koncentrace tymiánového oleje [hm. %]			
		0,5		1	
		Velikost [d·nm]	PdI	Velikost [d·nm]	PdI
P184	1%	453,8 ± 8,7	0,31 ± 0,01	288,5 ± 5,5	0,50 ± 0,03
	2%	403,4 ± 12,8	0,30 ± 0,02	278,3 ± 4,1	0,40 ± 0,06
	5%	331,1 ± 9,4	0,48 ± 0,01	317,8 ± 0,3	0,47 ± 0,01
P188	1%	160,1 ± 7,8	0,99 ± 0,01	581,1 ± 8,3	0,17 ± 0,02
	2%	29,7 ± 2,9	0,37 ± 0,02	299,1 ± 28,2	1,00 ± 0,00
	5%	34,0 ± 2,6	0,57 ± 0,01	27,0 ± 0,4	0,41 ± 0,01
P407	1%	34,9 ± 0,2	0,19 ± 0,01	46,1 ± 1,1	0,27 ± 0,04
	2%	31,5 ± 0,1	0,21 ± 0,02	46,6 ± 0,3	0,37 ± 0,00
	5%	24,6 ± 0,2	0,14 ± 0,01	39,5 ± 0,2	0,62 ± 0,04

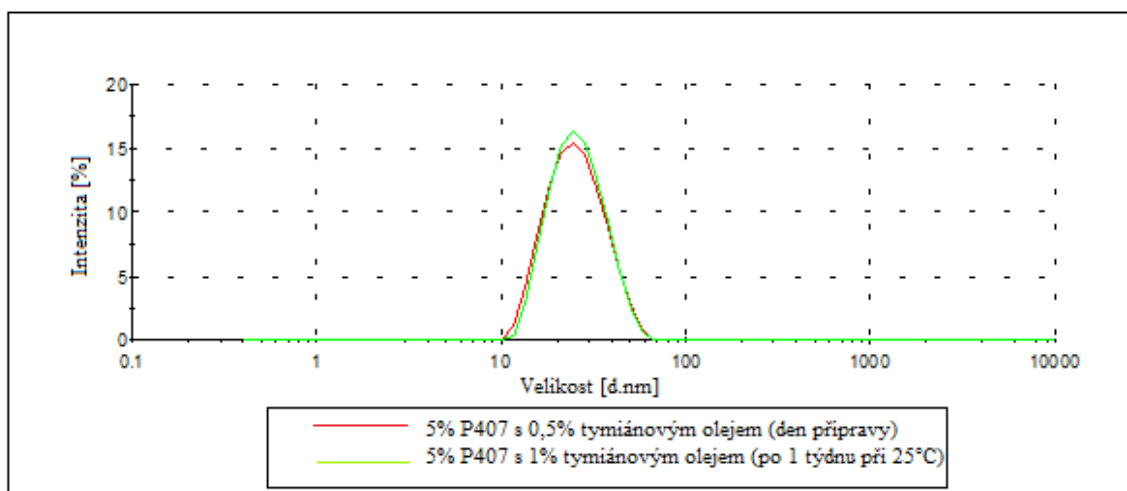
Tabulka 15. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s eukalyptovým olejem po týdnu při 25 °C

Typ a koncentrace poloxameru [hm. %]		Koncentrace eukalyptového oleje [hm. %]			
		0,5		1	
		Velikost [d·nm]	PdI	Velikost [d·nm]	PdI
P188	1%	206,2 ± 20,5	0,48 ± 0,09	248,7 ± 5,2	0,29 ± 0,04
	2%	199,7 ± 8,1	0,45 ± 0,01	219,7 ± 4,9	0,34 ± 0,06
	5%	257,2 ± 5,6	0,39 ± 0,06	104,4 ± 5,8	1,00 ± 0,00
P407	1%	39,5 ± 0,2	0,62 ± 0,04	63,9 ± 4,8	0,69 ± 0,20
	2%	30,3 ± 0,2	0,33 ± 0,01	34,3 ± 0,5	0,30 ± 0,02
	5%	27,8 ± 0,3	0,24 ± 0,02	31,9 ± 0,5	0,37 ± 0,05

Obecně vzorky poloxamerů o koncentraci 5 hm. % vykazovaly velmi dobrou stabilitu, což dokladují i přiložené distribuční křivky velikostí na Obr. 36 a Obr. 37.

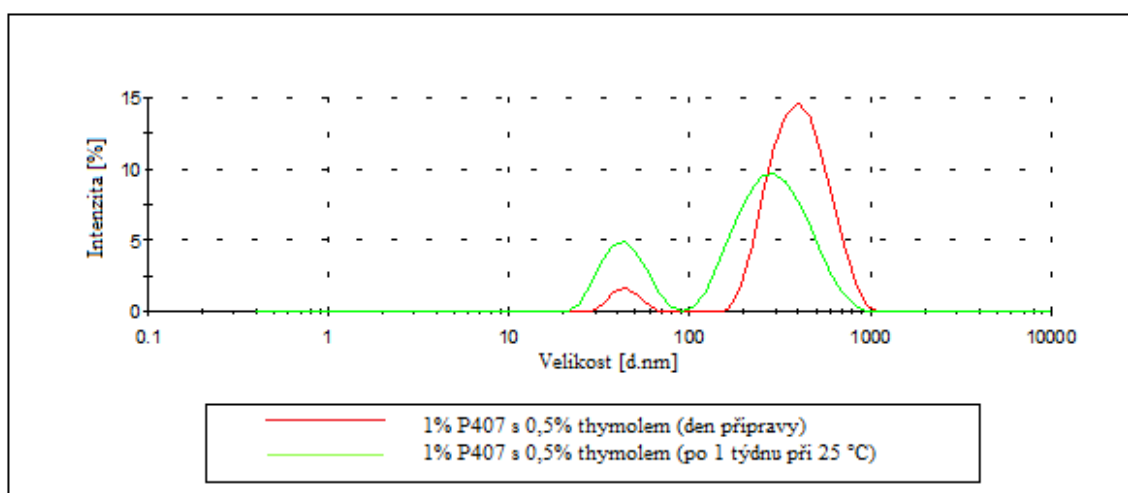


Obr. 36 Distribuční křivky velikosti částic 5 hm. % P407 s 0,5 hm. % thymolem



Obr. 37 Distribuční křivky velikosti částic 5 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % tymiánového oleje

Poměrně dobrá stabilita byla ovšem prokázána i u některých 1 hm. % roztoků poloxamerů. Ze srovnání distribučních křivek velikostí části (Obr. 38) je patrné, že například vzorky 1 hm. % P407 s thymolem nevykazovaly zásadní změny velikosti částic po týdenním skladování. Došlo pouze k mírnému rozšíření distribuční křivky a indexu PdI.



Obr. 38 Distribuční křivky velikosti částic 1 hm. % P407 s 0,5 hm. % thymolem

V rámci stabilitní studie byly vybrané vzorky hodnoceny i po 2 měsících skladování v lednici při teplotě 4 °C (Tabulka 16). Z dat je patrné, že v některých případech docházelo k výkyvům hodnot, a to jak ke zvyšování v důsledku agregační nestability (např. 1%ní P188 s thymolem), tak i k poklesu, z důvodu kinetické nestability (např. u vzorků P184

s přidavkem 1%ního eukalyptového oleje. Z vybraných vzorků se jako nejstabilnější při tomto testu jevil 5%ní P184 s 0,5 hm. % eukalyptového oleje, kde došlo pouze k mírnému snížení velikosti, a to ze 163 (viz Tabulka 12) na 126 nm, a vzorek 5%ní P188 s 0,5 hm. % thymolem, kde původní velikost částic byla 22 nm (viz Tabulka 10) a po 2 měsících 23 nm. Ve druhém zmíněném případě se nijak nezměnil ani index polydisperzity (0,24).

Tabulka 16. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s thymolem a eukalyptovým olejem po 2 měsících při 4 °C

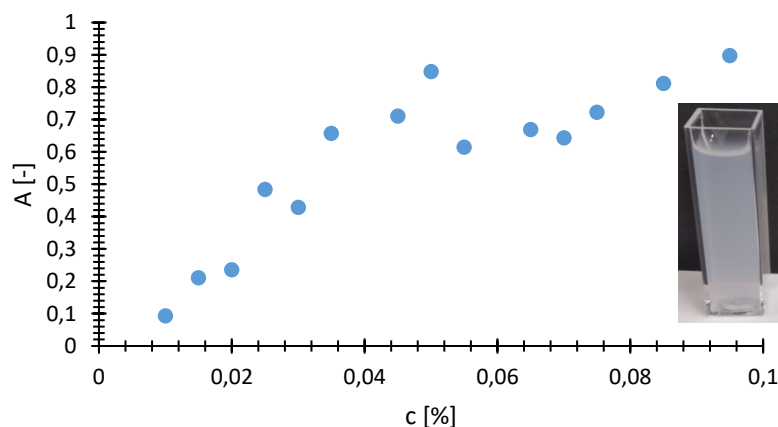
Typ a koncentrace poloxameru [hm. %]		Koncentrace thymolu [hm. %]			
		0,5		1	
		Velikost [d·nm]	PdI	Velikost [d·nm]	PdI
P188	1%	472,1 ± 6,7	0,21 ± 0,03	769,7 ± 60,4	0,38 ± 0,24
	2%	83,56 ± 1,9	0,94 ± 0,11	254,9 ± 6,0	0,14 ± 0,09
	5%	23,0 ± 0,4	0,24 ± 0,033	27,1 ± 0,7	0,38 ± 0,04
P407	1%	-	-	571,5 ± 13,7	0,28 ± 0,05
		Koncentrace eukalyptového oleje [hm. %]			
		Velikost [d·nm]	PdI	Velikost [d·nm]	PdI
P184	1%	333,5 ± 52,7	0,55 ± 0,08	461,9 ± 1,3	0,40 ± 0,09
	2%	150,9 ± 2,3	0,22 ± 0,01	228,5 ± 4,4	0,21 ± 0,03
	5%	126,2 ± 27,3	0,64 ± 0,12	68,4 ± 21,6	0,50 ± 0,12

V rámci hodnocení stability vzorků byly měřeny i hodnoty zeta potenciálu, u kterých ovšem nedocházelo k zásadním změnám oproti roztokům měřeným v den přípravy. Z toho důvodu zde nejsou zahrnuty.

8.7 Stanovení maximální aditivní koncentrace

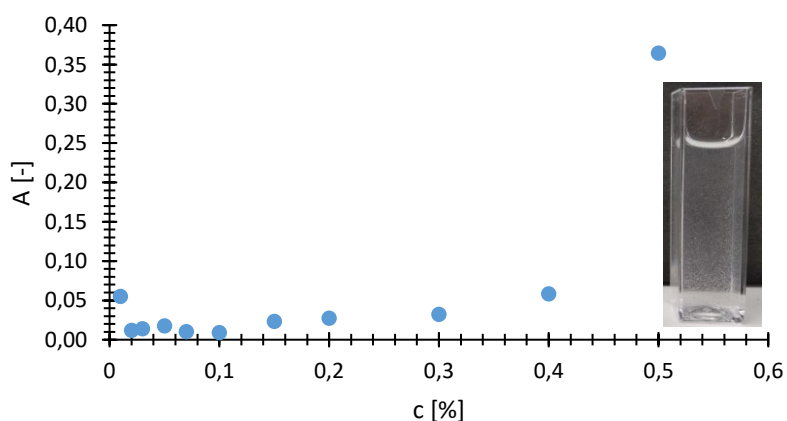
Maximální aditivní koncentrace (MAC) byla sledována pomocí spektrofotometrického měření při vlnové délce 630 nm pro vybranou aktivní látku tymiánový olej. Při zvyšování koncentrace hydrofobní aktivní látky lze předpokládat nárůst absorbance, indikující nasycení micely tenzidu a tvorbu kapek nesolubilizovaného esenciálního oleje, který je dispergován ve vodné fázi [65]. Na základě tohoto měření lze tedy vyhodnotit solubilizaci kapacitu daného tenzidu. Z výsledků (Obr. 39, Obr. 40, Obr. 41) je patrné, že testované tři

typy poloxamerů se chovaly rozdílně. U poloxameru P184 (Obr. 39) došlo již velmi brzy k zásadnímu nárůstu absorbance, což bylo zřejmé i při vizuálním hodnocení roztoku, který byl při koncentraci 0,1 hm. % tymiánového oleje již zcela zakalen. Za hodnotu MAC lze považovat oblast zásadního nárůstu hodnot, což v případě P184 nastává již při velmi nízké koncentraci, a to okolo 0,02 hm. %.



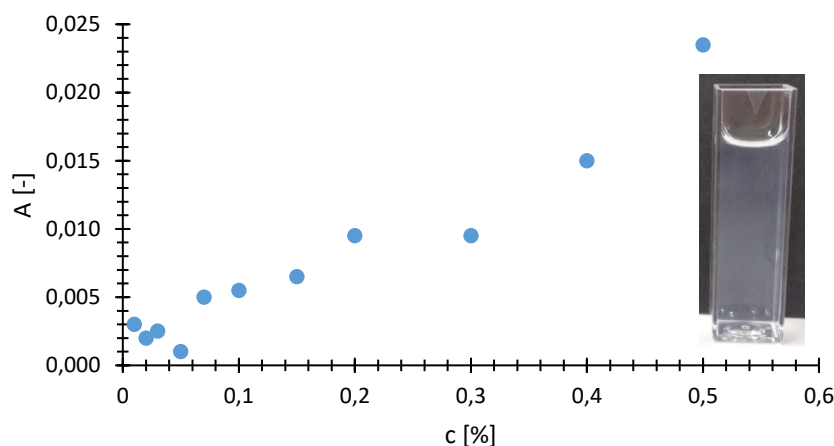
Obr. 39 Měření maximální aditivní koncentrace tymiánového oleje ve 2 hm. %ním P184

Na druhou stranu, absorbance roztoků poloxameru P188 (Obr. 40) se s koncentrací tymiánového oleje zvyšovala pomaleji. Při nižších koncentracích oleje (cca do 0,3 hm. %) byl nárůst hodnot spíše zanedbatelný, zásadní zvýšení bylo zaznamenáno při koncentraci 0,5 hm. %, kterou lze považovat za hodnotu MAC. Roztok byl při této koncentraci slabě zakalený.



Obr. 40 Měření maximální aditivní koncentrace tymiánového oleje ve 2 hm. %ním P188

Poloxamer P407 (Obr. 41) vykazoval při narůstající koncentraci tymiánového oleje mírný nárůst absorbance již od zhruba 0,1 hm. % ovšem zásadnější nárůst byl sledován od 0,3 hm. %.

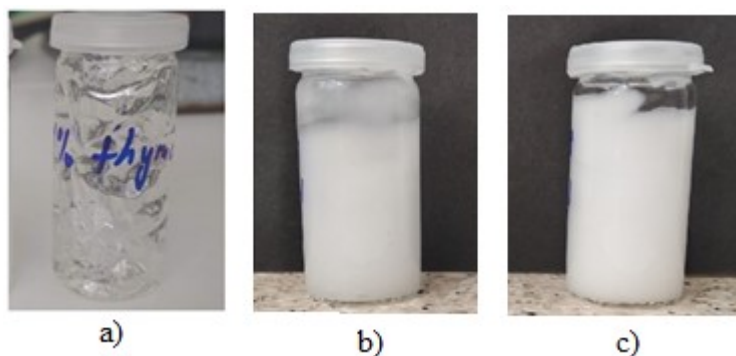


Obr. 41 Měření maximální aditivní koncentrace tymiánového oleje ve 2 hm. %ním P407

Je známo, že solubilizační kapacita tenzidů závisí na mnoha faktorech, jako například charakter hydrofobní složky i molekuly surfaktantu, koncentrace tenzidu, teplota, pH a iontová síla. Rao a kol. [66] se ve své práci zabývali studiem solubilizace citronového oleje do směsných micel na bázi neionických tenzidů. Tweenu 80 a monopalmitátu sacharózy. Byl zde potvrzen pozitivní vliv směsných micel a přídavku druhého tenzidu.

8.8 Stanovení antibakteriální účinnosti

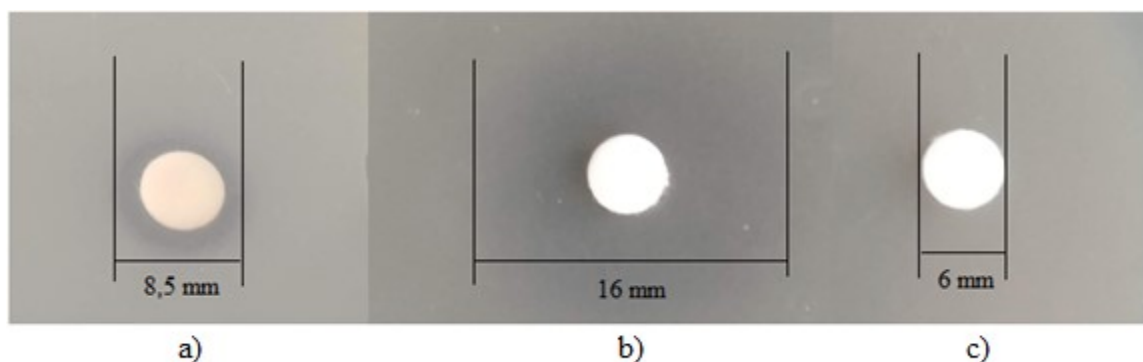
Antibakteriální účinek byl sledován pomocí diskové difuzní metody popsané v kapitole 7.11. Cílem bylo srovnat účinek samotných aktivních látek a námi připravených poloxamerních systémů s inkorporovanými aktivními činidly. Vzorky byly před testováním zakomponovány do carbopolového gelu, za účelem snazšího nanášení na misky s agarem. Samotný gel byl čirý a sloužil jako kontrola. Podobně vypadal i 1 hm. %ní thymol v gelu (Obr. 42a). Ostatní vzorky, byly mléčné a neprůhledné, na Obr. 42 b) a c) jsou znázorněny vzorky thymolu inkorporovaného do poloxamerů P184 a P188 a následně do carbopolu.



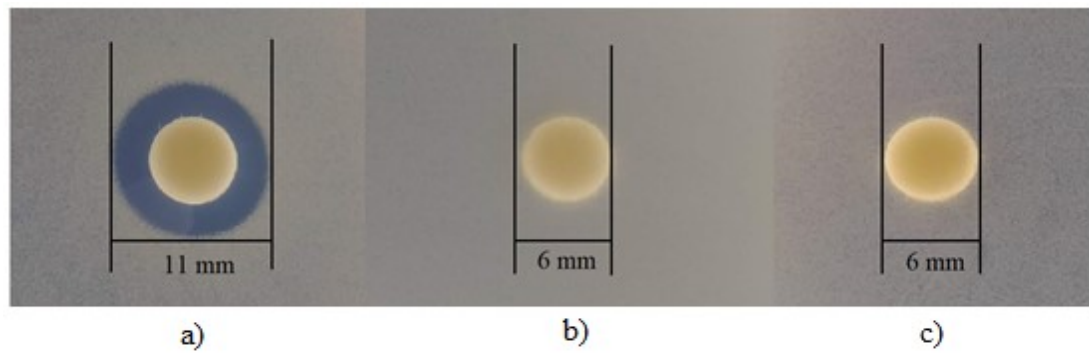
Obr. 42 a) thymol v gelu, b) thymol v P184 v gelu, c) thymol v P188 v gelu

Vzorky samotných aktivních látek, thymolu a tymiánového oleje v gelu prokázaly inhibiční účinek vůči vybraným mikroorganismům *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Průměrná inhibiční zóna tymiánového oleje byla 10,5 mm (měřeno jako průměr celé zóny včetně disku) vůči oběma bakteriím. Thymol prokázal účinnost pouze vůči *E. coli* (průměrná zóna 12 mm). Stejná koncentrace aktivní látky zabudované do poloxamerní částice nevykazovala žádný antibakteriální účinek. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že aktivní látky byly účinně enkapsulovány do micel poloxameru. Studium kinetiky jejich uvolňování bude muset být věnována pozornost během dalších experimentů.

Na Obr. 43 a Obr. 44 jsou výsledky agar difuzního testu vybraných směsí. Okolo vzorků aktivních látek, jež nebyly inkorporovány do poloxamerních částic, jsou patrné inhibiční zóny (Obr. 43a,b), Obr. 44a)). Na druhou stranu, systémy s poloxamery nevykazovaly žádný inhibiční účinek vůči testovaným bakteriím (Obr. 43c), Obr. 44b,c)).



Obr. 43 a) 1 hm. % tymiánový olej v gelu, b) 1 hm. % thymol v gelu, c) 1 hm. % thymol v P407 v gelu (*Escherichia coli*)



Obr. 44 a) 1 hm. % tymiánový olej v gelu, b) 1 hm. % tymiánový olej v P184 v gelu, c) 1 hm. % tymiánový olej v P188 v gelu (*Staphylococcus aureus*)

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla příprava a charakterizace poloxamerních roztoků samotných a s obsahem aktivních látek, a to thymolem, tymiánovým a eukalyptovým olejem. Vliv různých koncentrací kopolymerů a hmotnostních poměrů poloxamer/aktivní látka na fyzikálně-chemické vlastnosti připravených systémů byl sledován pomocí měření povrchového napětí, viskozity, zeta potenciálu, velikosti částic a pH. U vybraných vzorků byla také stanovena antibakteriální účinnost pomocí diskové difuzní metody.

V první části práce byly sledovány micelizační charakteristiky připravených roztoků. Hodnoty kritické micelární koncentrace poloxamerních částic se při 25 °C pohybovaly v rozsahu od 0,01 do 0,16 mM, což v podstatě korelovalo s hodnotami uvedenými v literatuře. Dále byly vyhodnoceny hodnoty Gibbsovy micelizační energie, adsorpce na rozhraní a plochy, kterou na rozhraní zaujímá jedna molekula povrchově aktivní látky. Záporné hodnoty Gibbsovy micelizační energie prokázaly spontánní tvorbu micel testovaných poloxamerů, kdy největší adsorpce ($4,03 \cdot 10^{-7}$ mol/m²) na rozhraní byla zaznamenána u poloxameru P184 s nejnižší molekulovou hmotností. Pomocí tenziometrie byl také potvrzen pozitivní vliv zvýšené teploty na proces micelizace, přičemž nejvýraznější pokles CMC byl sledován u poloxameru P188. Synergický účinek směsí tenzidů byl prokázán díky snížené hodnotě CMC, zvýšené adsorpce na rozhraní a také pomocí parametru β , jehož hodnoty se pohybovaly v rozsahu -1,6 do -3,8.

U připravených směsí bylo provedeno také viskozitní měření, které prokázalo dominantní vliv zvyšující se koncentrace poloxamerů (od 1 do 5 hm. %), a to jak bez, tak i s obsahem aktivních látek. Největší zvýšení viskozity bylo sledováno u P407 s nejvyšší molekulovou hmotností.

Rostoucí koncentrace poloxamerů měly vliv také na velikost částic, přičemž u poloxameru P184 docházelo ke zvyšování, zatímco u roztoků P188 a P407 byl sledován opačný děj. V případě směsí poloxamerů s aktivními činidly bylo pozorováno kolísání hodnot velikostí částic, v závislosti na více faktorech, a to jak na koncentraci kopolymeru, tak na typu a množství aktivního činidla. Velikost částic se pohybovala řádově od desítek do stovek nanometrů. Nejmenší částice obsahoval 5%ní P188 s 0,5 % thymolu (22 nm) a největší pak 5%ní P184 s 1 hm. % tymiánového oleje (693 nm).

Měření zeta potenciálu byly získány významně záporné hodnoty, a to jak bez, tak s přítomností aktivních látek v poloxamerních částicích.

Podstatnou část diplomové práce tvořila stabilitní studie, kdy byly poloxamerní roztoky hodnoceny jak vizuálně, tak pomocí měření velikosti částic a zeta potenciálu. Pozitivní efekt měla rostoucí koncentrace poloxameru. Co se týká aktivní látky, jako nejstabilnější vzorky se jevily směsi s eukalyptovým olejem, které během experimentu výrazně neměnily vzhled ani velikost částic a distribuci.

Jako doplňující experiment byla provedena disková difuzní metoda, díky níž byla u vybraných vzorků potvrzena účinnost enkapsulace aktivních látek do micel poloxamerů.

Závěrem lze říct, že byly připraveny a charakterizovány poloxamerní částice vykazující dostatečnou fyzikální stabilitu, které by mohly být využity jako perspektivní nosiče aktivních látek aplikovatelné například v potravinářském, kosmetickém či farmaceutickém průmyslu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NESMĚRÁK, Karel a Irena NĚMCOVÁ. Determination of Critical Micelle Concentration by Electrochemical Means. *Analytical Letters*. 2006, **39**(6), 1023-1040. DOI: 10.1080/00032710600620302. ISSN 0003-2719.
- [2] NARANG, A, D DELMARRE a D GAO. Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007, **345**(1-2), 9-25. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.08.057. ISSN 03785173.
- [3] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [4] *Co je co v povrchové a koloidní chemii* [online]. Praha: copyright, 2005 [cit. 2020-01-30]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-001/
- [5] MUÑOZ, María, Amalia RODRÍGUEZ, María del Mar GRACIANI a María Luisa MOYÁ. Conductometric, Surface Tension, and Kinetic Studies in Mixed SDS–Tween 20 and SDS–SB3-12 Micellar Solutions. *Langmuir*. 2004, **20**(25), 10858-10867. DOI: 10.1021/la048247n. ISSN 0743-7463.
- [6] ŠMIDRKAL, Jan. TENZIDY A DETERGENTY DNES. *Chemické listy*. 1999, (93), 421-427.
- [7] LI, Lingbing a Ye Bang TAN. Preparation and properties of mixed micelles made of Pluronic polymer and PEG-PE. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008, **317**(1), 326-331. DOI: 10.1016/j.jcis.2007.09.053. ISSN 00219797.
- [8] LÓPEZ-FONTÁN, José Luis, María J. SUÁREZ, Victor MOSQUERA a Félix SARMIENTO. Micellar Behavior of n-Alkyl Sulfates in Binary Mixed Systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000, **223**(2), 185-189. DOI: 10.1006/jcis.1999.6642. ISSN 00219797.
- [9] KREJČÍ, J., María J. SUÁREZ, Victor MOSQUERA a Félix SARMIENTO. Interaction of mixture of anionic surfactants with collagen. *International Journal of Cosmetic Science*. 2007, **29**(2), 121-129. DOI: 10.1111/j.1467-2494.2007.00368.x. ISSN 0142-5463.
- [10] ROSEN, Milton J. *Surfactants and interfacial phenomena*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2004. ISBN 04-714-7818-0.

- [11] BLAŽEJ, Anton. *Tenzidy*. 1. Bratislava: Alfa, 1977.
- [12] KRUGLÍAKOV, P. M. *Hydrophile-lipophile balance of surfactants and solid particles: physicochemical aspects and applications*. New York: Elsevier Science B. V., 2000. Studies in interface science, v. 9. ISBN 04-445-0257-2.
- [13] MYERS, Drew. *Surfactant science and technology*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: J. Wiley, c2006. ISBN 04-716-8024-9.
- [14] GODDARD, E. D. a Kavssery P. ANANTHAPADMANABHAN. *Interactions of surfactants with polymers and proteins*. Boca Raton: CRC Press, c1993. ISBN 08-493-6784-0.
- [15] ATIF FAIZ AFZAL, Mohammad. *Pluronic block copolymer micelles: structure and dynamics* [online]. [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/0b58/e57ffd3092b7aef0c656b31751fd8ce3451f.pdf>
- [16] ALMEIDA, Mauro, Mariana MAGALHÃES, Francisco VEIGA a Ana FIGUEIRAS. Poloxamers, poloxamines and polymeric micelles: Definition, structure and therapeutic applications in cancer. *Journal of Polymer Research*. 2018, **25**(1). DOI: 10.1007/s10965-017-1426-x. ISSN 1022-9760
- [17] SAKHO, El Hadji Mamour, Elaheh ALLAHYARI, Oluwatobi S. OLUWAFEMI, Sabu THOMAS a Nandakumar KALARIKKAL. Dynamic Light Scattering (DLS). *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*. Elsevier, 2017, 37-49. DOI: 10.1016/B978-0-323-46139-9.00002-5. ISBN 9780323461399.
- [18] *Zetasizer Nano Series: User Manual* [online]. 2004 [cit. 2020-02-06]. Dostupné z: http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf
- [19] ATAHAR, Amiya, Noushaba Nusrat MAFY, M. Muhibur RAHMAN, M. Yousuf Ali MOLLAH a Md. Abu Bin Hasan SUSAN. Aggregation of urea in water: Dynamic light scattering analyses. *Journal of Molecular Liquids*. 2019, **294**. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.111612. ISSN 01677322.
- [20] LU, Guang Wei a Ping GAO. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*.

- Elsevier, 2010, 2010, , 59-94. DOI: 10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4. ISBN 9780815520252.
- [21] KULTHE, Sushant S., Yogesh M. CHOUDHARI, Nazma N. INAMDAR a Vishnukant MOURYA. Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery. *Designed Monomers and Polymers*. 2012, **15**(5), 465-521. DOI: 10.1080/1385772X.2012.688328. ISSN 1568-5551.
- [22] HUSSEIN, Yasser a Mohamed YOUSSEY. Polymeric Micelles of Biodegradable Diblock Copolymers: Enhanced Encapsulation of Hydrophobic Drugs. *Materials*. 2018, **11**(5). DOI: 10.3390/ma11050688. ISSN 1996-1944.
- [23] BATRAKOVA, Elena V., Tatiana K. BRONICH, Joseph A. VETRO a Alexander V. KABANOV. Polymer Micelles as Drug Carriers. *Nanoparticulates as Drug Carriers*. PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO, 2006, 2006-09-26, , 57-93. DOI: 10.1142/9781860949074_0005. ISBN 978-1-86094-630-1.
- [24] BILIA, Anna Rita, Clizia GUCCIONE, Benedetta ISACCHI, Chiara RIGHESCHI, Fabio FIRENZUOLI a Maria Camilla BERGONZI. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014, **2014**, 1-14. DOI: 10.1155/2014/651593. ISSN 1741-427X.
- [25] MARTINS, Isabel M., Maria F. BARREIRO, Manuel COELHO a Alírio E. RODRIGUES. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*. 2014, **245**, 191-200. DOI: 10.1016/j.cej.2014.02.024. ISSN 13858947.
- [26] CASANOVA, Francisca a Lúcia SANTOS. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation*. 2015, **33**(1), 1-17. DOI: 10.3109/02652048.2015.1115900. ISSN 0265-2048.
- [27] LUÍS, Ângelo, Andreia DUARTE, Jorge GOMINHO, Fernanda a Ana Paula DUARTE. *Industrial Crops and Products*. 2016, **79**. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.10.055. ISSN 09266690.

- [28] HÜSNÜ CAN BAŞER, K a Gerhard BUCHBAUER. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition*. 2. Taylor & Francis Group, 2016. ISBN 978-1-4665-9047-2.
- [29] WALCZAK, Maciej, Marta MICHALSKA-SIONKOWSKA, Beata KACZMAREK a Alina SIONKOWSKA. Surface and antibacterial properties of thin films based on collagen and thymol. *Materials Today Communications*. 2020, **22**. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2020.100949. ISSN 23524928.
- [30] WATTANASATCHA, Anna, Sirirat RENGPIPAT, Supason WANICHWECHARUNGRUANG a Alina SIONKOWSKA. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, **434**(1-2), 360-365. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.017. ISSN 03785173.
- [31] BOSE, Adity, Priti SENGUPTA, Uttam PAL, Sanjib SENAPATI, Mohd. AHSAN, Santanu ROY, Upasana DAS a Kamalika SEN. Encapsulation of Thymol in cyclodextrin nano-cavities: A multi spectroscopic and theoretical study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2019, **208**, 339-348. DOI: 10.1016/j.saa.2018.10.011. ISSN 13861425.
- [32] FREI, Balz. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*. 1994, **97**(3), S5-S13. DOI: 10.1016/0002-9343(94)90292-5. ISSN 00029343.
- [33] DRACH, M., J. NARKIEWICZ-MICHAŁEK, A. SIENKIEWICZ, M. SZYMULA a C. BRAVO-DÍAZ. Antioxidative properties of vitamins C and E in micellar systems and in microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, **379**(1-3), 79-85. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.11.073. ISSN 09277757.
- [34] CASANOVA, Francisca a Lúcia SANTOS. Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review. *Journal of Microencapsulation*. 2015, **33**(1), 1-17. DOI: 10.3109/02652048.2015.1115900. ISSN 0265-2048.
- [35] AMIRI, Saba, Babak GHANBARZADEH, Hamed HAMISHEHKAR, Mohammadyar HOSEIN, Afshin BABAZADEH a Perihan ADUN. Vitamin E Loaded Nanoliposomes: Effects of Gammaoryzanol, Polyethylene Glycol and Lauric Acid on Physicochemical Properties. *Colloid and Interface Science*

- Communications*. 2018, **26**, 1-6. DOI: 10.1016/j.colcom.2018.07.003. ISSN 22150382.
- [36] HATEGEKIMANA, Joseph, Kingsley George MASAMBA, Jianguo MA a Fang ZHONG. Encapsulation of vitamin E: Effect of physicochemical properties of wall material on retention and stability. *Carbohydrate Polymers*. 2015, **124**, 172-179. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.01.060. ISSN 01448617.
- [37] *Pluracare L/F Grades Poloxamer* [online]. 2008 [cit. 2020-02-03]. Dostupné z: http://www.rumapel.com.ar/cosmetica_miscelaneos/ficha_tecnica/Pluracare%20L-%20F%20Grades.pdf
- [38] Safety Assessment of Poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, Poloxamer 105 Benzoate, and Poloxamer 182 Dibenzoate as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 2008, **27**(2_suppl), 93-128. DOI: 10.1080/10915810802244595. ISSN 1091-5818.
- [39] *Poloxamera: Poloxamery* [online]. 2000 [cit. 2020-02-03]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Polaxamera.htm
- [40] EMANUELE, Martin a Balu BALASUBRAMANIAM. *Differential Effects of Commercial-Grade and Purified Poloxamer 188 on Renal Function*. 2014, **14**(2), 73-83. DOI: 10.1007/s40268-014-0041-0. ISSN 1174-5886.
- [41] *Kolliphor® P188* [online]. BASF SE: Copyright ©, 2019 [cit. 2020-02-03]. Dostupné z: <https://pharmaceutical.basf.com/en/Drug-Formulation/Kolliphor-P188.html>
- [42] GIULIANO, Elena, Donatella PAOLINO, Massimo FRESTA a Donato COSCO. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. *Pharmaceutics*. 2018, **10**(3). DOI: 10.3390/pharmaceutics10030159. ISSN 1999-4923.
- [43] *Kolliphor® P407* [online]. BASF SE: Copyright ©, 2019 [cit. 2020-02-05]. Dostupné z: <https://pharmaceutical.basf.com/en/Drug-Formulation/Kolliphor-P407.html>

- [44] COSTA, Raquel a Lúcia SANTOS. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology*. 2017, **322**, 402-416. DOI: 10.1016/j.powtec.2017.07.086. ISSN 00325910.
- [45] LOHCHAROENKAL, Warangkana, Liying WANG, Yi Charlie CHEN a Yon ROJANASAKUL. Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. *BioMed Research International*. 2014, **2014**, 1-12. DOI: 10.1155/2014/180549. ISSN 2314-6133.
- [46] CHIAPPETTA, Diego A. a Alejandro SOSNIK. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007, **66**(3), 303-317. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.03.022. ISSN 09396411.
- [47] CHAUDHARI, Shilpa Praveen a Jayashree Ramesh PATIL. Study of block copolymer micelles as vehicles for hydrophobic drug Lamotrigine. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2014, **48**(supplementary), 55-66. DOI: 10.5530/ijper.48.4s.8. ISSN 00195464.
- [48] REN, Jin, Zhengjie FANG, Li YAO, Fatima Zohra DAHMANI, Lifang YIN, Jianping ZHOU a Jing YAO. A micelle-like structure of poloxamer–methotrexate conjugates as nanocarrier for methotrexate delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, **487**(1-2), 177-186. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.014. ISSN 03785173. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315003221>
- [49] JINDAL, Neha a S.K. MEHTA. Nevirapine loaded Poloxamer 407/Pluronic P123 mixed micelles: Optimization of formulation and in vitro evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015, **129**, 100-106. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.03.030. ISSN 09277765.
- [50] MINNELLI, Cristina, Paolo MORETTI, Gianluca FULGENZI, Paolo MARIANI, Emiliano LAUDADIO, Tatiana ARMENI, Roberta GALEAZZI a Giovanna MOBBILI. A Poloxamer-407 modified liposome encapsulating epigallocatechin-3-gallate in the presence of magnesium: Characterization and protective effect against oxidative damage. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018, **552**(1-2), 225-234. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.004. ISSN 03785173.

- [51] SAMITH, Vicente D., Germán MIÑO, E. RAMOS-MOORE a Nicolás ARANCIBIA-MIRANDA. Effects of pluronic F68 micellization on the viability of neuronal cells in culture. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013, **130**(3), 2159-2164. DOI: 10.1002/app.39426. ISSN 00218995.
- [52] PEPIĆ, I., J. FILIPOVIĆ-GRČIĆ, I. JALŠENJAK a Nicolás ARANCIBIA-MIRANDA. Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008, **327**(1-3), 95-102. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2008.06.009. ISSN 09277757.
- [53] SVITOVA, T. F. a C. J. RADKE. *AOT and Pluronic F68 Coadsorption at Fluid/Fluid Interfaces: A Continuous-Flow Tensiometry Study*. 2005, **44**(5), 1129-1138. DOI: 10.1021/ie049676j. ISSN 0888-5885.
- [54] PEPIĆ, I., N. JALŠENJAK a I. JALŠENJAK. Micellar solutions of triblock copolymer surfactants with pilocarpine. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004, **272**(1-2), 57-64. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.11.032. ISSN 03785173.
- [55] GYULAI, G., A. MAGYAR, J. ROHONCZY, J. OROSZ, M. YAMASAKI, Sz. BOSZE a E. KISS. Preparation and characterization of cationic Pluronic for surface modification and functionalization of polymeric drug delivery nanoparticles. *Express Polymer Letters*. 2016, **10**(3), 216-226. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2016.20. ISSN 1788618X.
- [56] THURN, T., S. COUDERC, J. SIDHU, D. M. BLOOR, J. PENFOLD, J. F. HOLZWARTH a E. WYN-JONES. Study of Mixed Micelles and Interaction Parameters for ABA Triblock Copolymers of the Type EO_m-PO_n-EO_m and Ionic Surfactants: Equilibrium and Structure. *Langmuir*. 2002, **18**(24), 9267-9275. DOI: 10.1021/la020629a. ISSN 0743-7463.
- [57] BODRATTI, Andrew a Paschalis ALEXANDRIDIS. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*. 2018, **9**(1). DOI: 10.3390/jfb9010011. ISSN 2079-4983.
- [58] AL-OBAIDY, Saba S. M., Gillian M. GREENWAY a Vesselin N. PAUNOV. Dual-functionalised shellac nanocarriers give a super-boost of the antimicrobial action of berberine. *Nanoscale Advances*. 2019, **1**(2), 858-872. DOI: 10.1039/C8NA00121A. ISSN 2516-0230.

- [59] PHUC LE, Thi Minh, Van Phuc PHAM, Thi Minh LUA DANG, Thi HUYEN LA, Thi Hanh LE a Quang Huan LE. Preparation of curcumin-loaded pluronic F127/chitosan nanoparticles for cancer therapy. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2013, **4**(2). DOI: 10.1088/2043-6262/4/2/025001. ISSN 2043-6262.
- [60] HAN, Fei, Sanming LI, Ran YIN, Hongzhuo LIU a Lu XU. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008, **315**(1-3), 210-216. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.08.005. ISSN 09277757.
- [61] ELGEGREN, Mariela, Suyeon KIM, Diego CORDOVA, Carla SILVA, Jennifer NORO, Artur CAVACO-PAULO a Javier NAKAMATSU. Ultrasound-Assisted Encapsulation of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo.) Oil in Alginate-Chitosan Nanoparticles. *Polymers*. 2019, **11**(8). DOI: 10.3390/polym11081245. ISSN 2073-4360.
- [62] KRHOVSKÁ, Dita. *Polymer/surfaktant systémy pro enkapsulaci aktivních látek*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2019, 84 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/45617>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Vedoucí práce Sedlaříková, Jana.
- [63] SEDLAŘÍKOVÁ, Jana, Magda JANALÍKOVÁ, Ondřej RUDOLF, Jana PAVLAČKOVÁ, Pavlína EGNER, Petra PEER, Vendula VARAŘOVÁ a Jiří KREJČÍ. Chitosan/Thyme Oil Systems as Affected by Stabilizing Agent: Physical and Antimicrobial Properties. *Coatings*. 2019, **9**(3). DOI: 10.3390/coatings9030165. ISSN 2079-6412.
- [64] TUREK, Claudia a Florian C. STINTZING. Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013, **12**(1), 40-53. DOI: 10.1111/1541-4337.12006. ISSN 15414337.
- [65] DENG, Ling-Li, Maierhaba TAXIPALATI, Fei QUE a Hui ZHANG. Physical characterization and antioxidant activity of thymol solubilized Tween 80 micelles. *Scientific Reports*. 2016, **6**(1). DOI: 10.1038/srep38160. ISSN 2045-2322.

- [66] RAO, Jiajia, David Julian MCCLEMENTS, Fei QUE a Hui ZHANG. Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions. *Food Hydrocolloids*. 2012, **26**(1), 268-276. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.06.002. ISSN 0268005X.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AFM	Mikroskopie atomárních sil
CMC	Kritická micelární koncentrace
DLS	Dynamic Light Scattering
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
EGCG	epigallocatechin-3-gallat
EO	Ethylen oxid
EC	<i>Escherichia coli</i>
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourierova transformace
GRAS	Generally Recognized as safe
HLB	Hydrofilně-lipofilní rovnováha
ISO	International Organization for Standardization
MAC	Maximální aditivní koncentrace
MO	Mikroorganismus
MPEG	Methoxy poly(ethylen glykol)
O/V	Olej ve vodě
PBCL	Poly(α -benzylkarboxylát- ϵ -kaprolakton)
PEO	Poly(ethylenoxid)
PEG	Poly(ethylen glykol)
PCL	Poly(ϵ -kaprolakton)
PO	Propylen oxid
PPO	Poly(propylenoxid)
P184	Poloxamer 184
P188	Poloxamer 188
P407	Poloxamer 407

SA *Staphylococcus aureus*

TEM Transmisní elektronová mikroskopie

UTZ Ultrazvuk

V/O Voda v oleji

XRD Rentgenová difrakční studie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Schématické znázornění dynamické rovnováhy mezi monomery v roztoku a monomery na rozhraní [1]	11
Obr. 2 Metody používané pro stanovení CMC [1]	13
Obr. 3 Schématické znázornění elektrostatického potenciálu [18].....	18
Obr. 4 Chemická struktura thymolu [31].....	24
Obr. 5 Chemický vzorec poloxameru 184 ($m = 26$, $n = 30$, molekulová hmotnost 2900 g/mol) [40].....	26
Obr. 6 Struktura poloxameru 188 ($m = 30$, $n = 160$, molekulová hmotnost 8400 g/mol) [40]	27
Obr. 7 Struktura poloxameru 407 ($m = 67$, $n = 200$, molekulová hmotnost 12 600 g/mol) [40].....	28
Obr. 8 a) Vzorky 2 hm. % P184 s 0,5 a 1 hm. % thymolem b) Vzorky 5 hm. % P184 s 0,5 a 1 hm. % eukalyptovým olejem	37
Obr. 9 Tenziometr EasyDyne, Krüss	38
Obr. 10 Viskozimetr Brookfield	39
Obr. 11 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu P188 při 25 °C	41
Obr. 12 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu P184 při 25 °C a 45 °C	44
Obr. 13 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu P188 při 25 °C a 45 °C	44
Obr. 14 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci tenzidu P407 při 25 °C a 45 °C	45
Obr. 15 Graf závislosti povrchového napětí na koncentraci směsi tenzidů při 25 °C	46
Obr. 16 Měření bodu zákalu 1 hm. % P184 vzhled roztoku a) pod bodem zákalu, b) nad bodem zákalu	47
Obr. 17 Graf závislosti viskozity na koncentraci poloxamerů.....	48
Obr. 18 Graf závislosti viskozity na koncentraci tenzidu P184 s aktivními látkami.....	49
Obr. 19 Graf závislosti viskozity na koncentraci tenzidu P188 s aktivními látkami.....	49
Obr. 20 Graf závislosti viskozity na koncentraci tenzidu P407 s aktivními látkami.....	50
Obr. 21 Graf závislosti velikosti částic a polydisperzity na koncentraci tenzidu P184.....	51
Obr. 22 Graf závislosti velikosti částic a polydisperzity na koncentraci tenzidu P188.....	51
Obr. 23 Graf závislosti velikosti částic a polydisperzity na koncentraci tenzidu P407.....	52
Obr. 24 Graf závislosti zeta potenciálu a pH na koncentraci tenzidů.....	55
Obr. 25 Graf závislosti zeta potenciálu a pH na koncentraci tenzidu P184.....	57
Obr. 26 Graf závislosti zeta potenciálu a pH na koncentraci tenzidu P188.....	57
Obr. 27 Graf závislosti zeta potenciálu a pH na koncentraci tenzidu P407.....	58

Obr. 28 Vzorky 2 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % thymolem a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C	59
Obr. 29 Vzorky 5 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % thymolem a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C	59
Obr. 30 Vzorky 1 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % tymiánovým olejem a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C.....	60
Obr. 31 Vzorky 2 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % tymiánovým olejem a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C.....	60
Obr. 32 Vzorky 5 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % tymiánovým olejem a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C.....	60
Obr. 33 Vzorky 1 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % eukalyptovým olejem a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C.....	61
Obr. 34 Vzorky 2 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % eukalyptovým olejem a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C.....	61
Obr. 35 Vzorky 5 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % eukalyptovým olejem a) v den přípravy, b) po týdnu při 25 °C, c) po 2 měsících při 4 °C.....	61
Obr. 36 Distribuční křivky velikosti částic 5 hm. % P407 s 0,5 hm. % thymolem.....	63
Obr. 37 Distribuční křivky velikosti částic 5 hm. % P407 s 0,5 a 1 hm. % tymiánového oleje	64
Obr. 38 Distribuční křivky velikosti částic 1 hm. % P407 s 0,5 hm. % thymolem.....	64
Obr. 39 Měření maximální aditivní koncentrace tymiánového oleje ve 2 hm. %ním P184	66
Obr. 40 Měření maximální aditivní koncentrace tymiánového oleje ve 2 hm. %ním P188	66
Obr. 41 Měření maximální aditivní koncentrace tymiánového oleje ve 2 hm. %ním P407	67
Obr. 42 a) thymol v gelu, b) thymol v P184 v gelu, c) thymol v P188 v gelu.....	68
Obr. 43 a) 1 hm. % tymiánový olej v gelu, b) 1 hm. % thymol v gelu, c) 1 hm. % thymol v P407 v gelu (<i>Escherichia coli</i>).....	68
Obr. 44 a) 1 hm. % tymiánový olej v gelu, b) 1 hm. % tymiánový olej v P184 v gelu, c) 1 hm. % tymiánový olej v P188 v gelu (<i>Staphylococcus aureus</i>)	69

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Příklady polymerních micel s inkorporovanými léčivými látkami [21], [22] ...	21
Tabulka 2. Vlastnosti poloxameru 184 [16], [37].....	26
Tabulka 3. Vlastnosti poloxameru 188 [16], [37].....	27
Tabulka 4. Vlastnosti poloxameru 407 [16], [37].....	28
Tabulka 5. Podmínky přípravy roztoků	36
Tabulka 6. Micelární charakteristiky poloxamerních roztoků při 25 °C	43
Tabulka 7. Micelární charakteristiky poloxamerních roztoků při 45 °C	43
Tabulka 8. Micelární charakteristiky směsí poloxamerních roztoků v poměru 1:1	46
Tabulka 9. Bod zákalu poloxamerních roztoků	47
Tabulka 10. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s thymolem	53
Tabulka 11. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s tymiánovým olejem	54
Tabulka 12. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s eukalyptovým olejem.....	54
Tabulka 13. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s thymolem po týdnu při 25 °C.	62
Tabulka 14. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s tymiánovým olejem po týdnu při 25 °C	62
Tabulka 15. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s eukalyptovým olejem po týdnu při 25 °C.....	63
Tabulka 16. Velikost částic a polydisperzita poloxamerů s thymolem a eukalyptovým olejem po 2 měsících při 4 °C.....	65

